

FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

1º ANO

1º SEMESTRE

BIOLOGIA CELULAR

Jorge Paulos

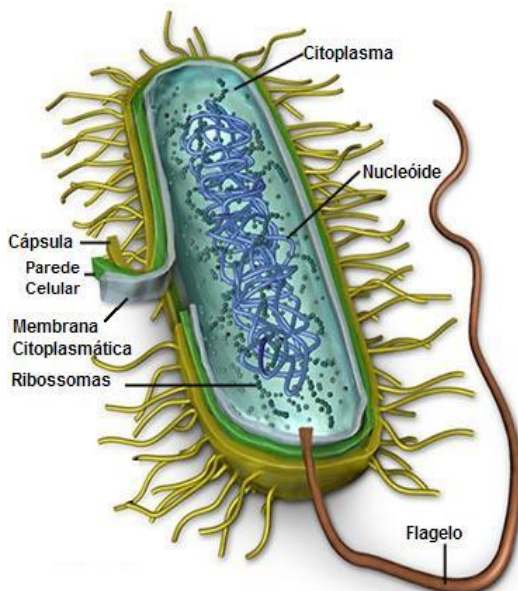
Capítulo 1 - A evolução da célula

1. Do Procarionte ao Eucarionte

A identidade celular foi conseguida a partir do momento em que a primeira célula ganha uma membrana plasmática, com funções de protecção e regulação da entrada e saída de substâncias da célula. Isto fez com que o meio intracelular fosse diferente do meio externo, do ponto de vista físico-químico. Porém, o grande avanço adaptativo sofrido pelas células foi a formação de vesículas, compartimentos e retículos originados da membrana primordial. Com isto, nasce a **célula eucariótica**, com o seu sistema de endomembranas.

Este sistema possibilitou:

- ✚ Maior crescimento celular;
- ✚ Maior especialização, divisão de tarefas entre componentes celulares e eficiência metabólica;
- ✚ Maior protecção do material hereditário;
- ✚ Maior diversidade de rotas metabólicas;
- ✚ Facilidade no contacto e na aglomeração intermolecular.



As **células procarióticas** são muito diferentes das eucarióticas. A sua principal característica é, então, a ausência de membrana celular, individualizando assim, o núcleo. Para além disso, não têm alguns organelos, o que lhes confere um tamanho bastante reduzido. O DNA que possuem encontra-se na forma de um anel não-associado a proteínas.

- ✚ Eubactérias – verdadeiras bactérias
- ✚ Arqueobactérias – células primitivas, geralmente anaeróbias, que vivem nos ambientes mais inóspitos.

As **células eucarióticas** são mais complexas que as procarióticas. Possuem membrana nuclear individualizada e vários tipos de organelos. A maioria dos animais e plantas a que estamos habituados estão dotados deste tipo de células.

- | | |
|----------------|--------------------|
| ✚ Fungos | ✚ Células animais |
| ✚ Protozoários | ✚ Células vegetais |

	Procariontes	Eucariontes
Organismos	Bactérias, Cianobactérias	Protistas, Fungos, Plantas, Animais
Medida	10 µm	10 - 100 nm
Metabolismo	Anaeróbio, Aeróbio	Aeróbio
Organelas	Ausentes	Núcleo, Complexo de Golgi, Mitocôndria, Retículo Endoplasmático, etc.
RNA e proteínas	Ambos sintetizados no mesmo local	RNA sintetizado no núcleo; Proteínas sintetizadas no citoplasma
Ribossomas	Tipo 70S	Tipo 80S
Citoplasma	Não tem citosqueleto: correntes citoplasmáticas, exocitose e endocitose ausentes	Tem citosqueleto: correntes citoplasmáticas, exocitose e endocitose presentes
Organização	Principalmente unicelular	Principalmente multicelular
Fontes	Necessitam de uma fonte de C e de N	Requerem uma grande quantidade de compostos e alguns iões

2. Do RNA ao DNA

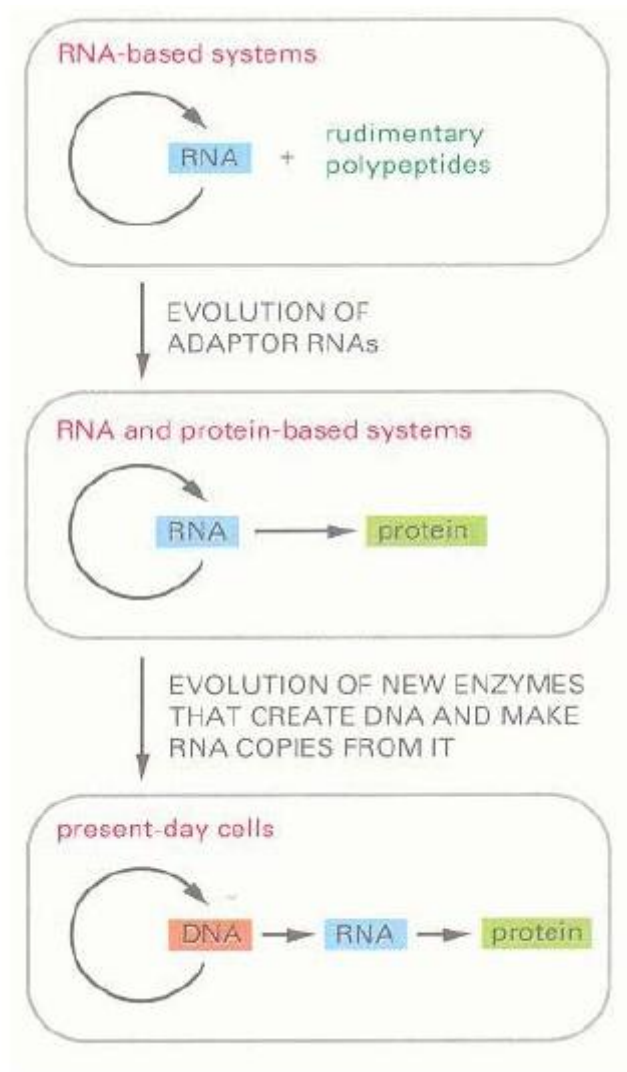
No processo de evolução celular, atravessaram-se as seguintes fases:

- ✚ RNA capaz de dirigir a sua auto-replicação;
- ✚ RNA capaz de intervir na síntese de proteínas (ribossomas);
- ✚ Aparecimento da membrana celular;
- ✚ Aparecimento do DNA como molécula mais estável do que o RNA, e com capacidade para dirigir a sua própria replicação (replicação semi-conservativa).

O DNA é mais estável do que o RNA porque:

- ✚ Tem uma desoxirribose em vez de uma ribose. A ribose tem um grupo OH no carbono 2' que pode sofrer hidrólise;
- ✚ O DNA é constituído por 2 cadeias anti-paralelas, sendo mais difícil ocorrerem mutações;
- ✚ O DNA possui a base timina, em vez do uracilo. Este último é mais instável pois pode sofrer metilação;
- ✚ O DNA possui um mecanismo de auto-reparação de erros.

Assim, o RNA foi progressivamente substituído pelo DNA, que ganhou uma importância vital para os organismos vivos.



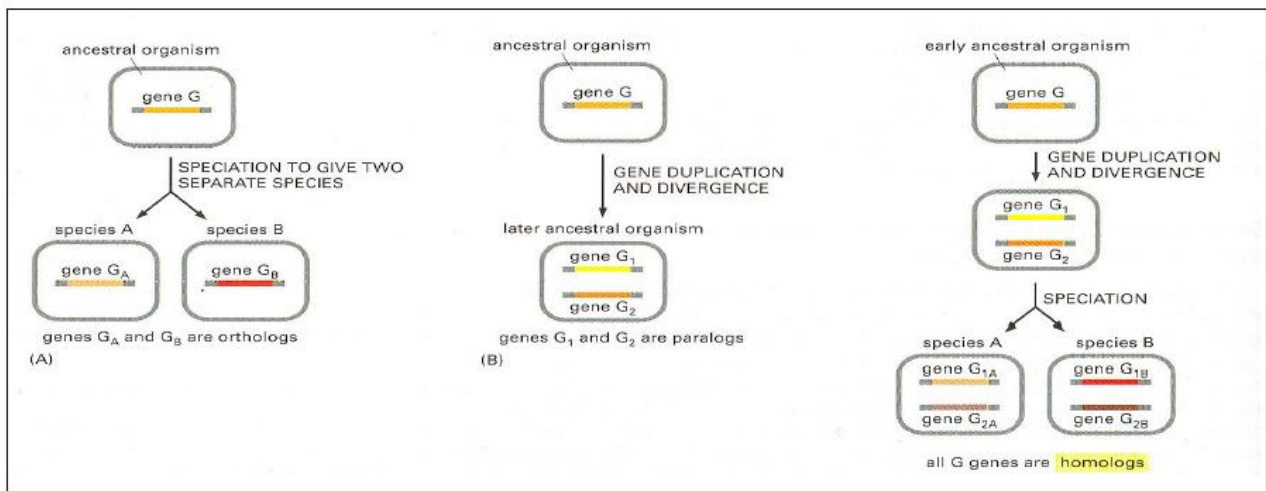
3. Aparecimento de novos genes

- ✚ Mutação Intragénica
- ✚ Duplicação Génica
- ✚ Troca de segmentos de DNA entre dois genes
- ✚ Mutação Horizontal

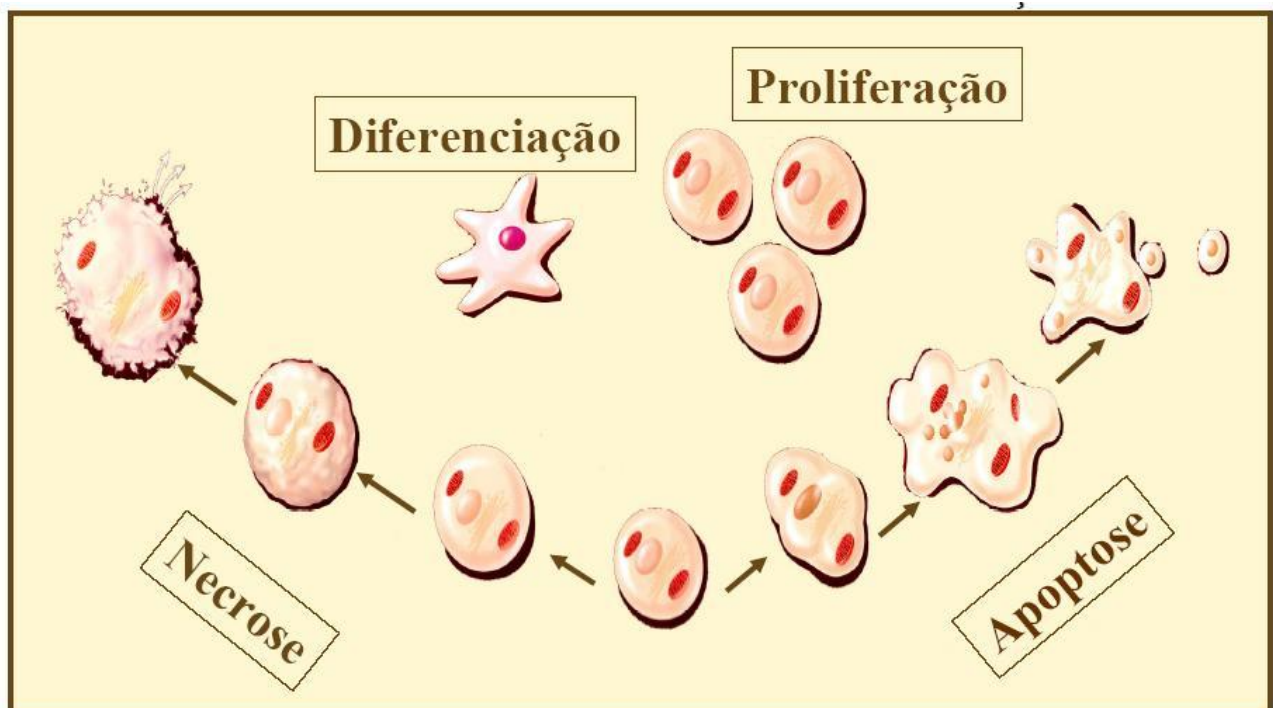
Genes Ortólogos – genes considerados homólogos que apresentam a mesma função em organismos diferentes mas provenientes do mesmo organismo progenitor (genes alterados dentro de linhagens específicas, após diferenciação).

Genes Parálogos – genes considerados homólogos, presentes num mesmo organismo, que não apresentam a mesma função. Assim, estes genes são duplicados dentro de uma mesma linhagem, não importando se têm a mesma função ou não.

Genes Homólogos – são genes que apesar de pertencerem a diferentes organismos, são estruturalmente semelhantes e cumprem funções idênticas.



4. Alterações celulares em células animais



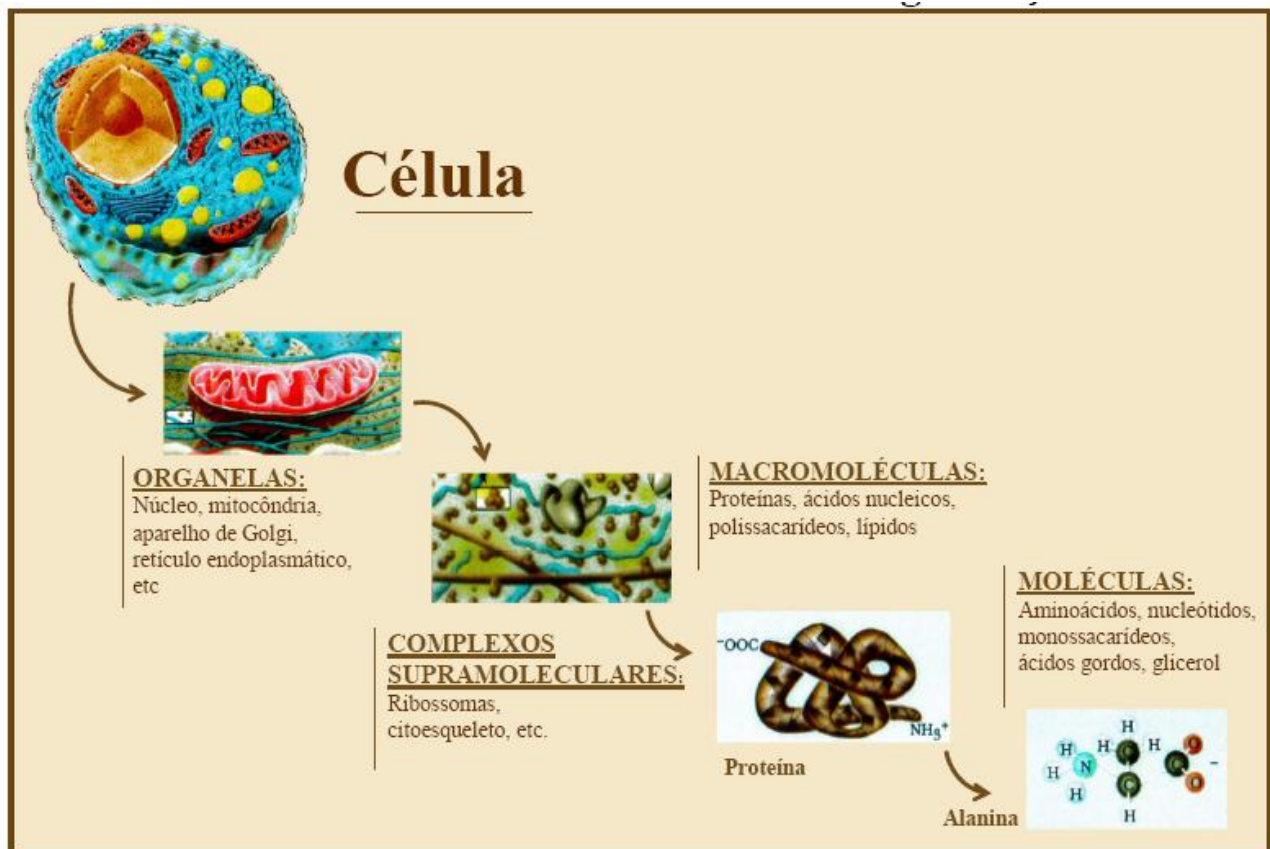
Necrose – todo o conteúdo intracelular é expulso para o exterior, sendo associada a vários tipos de células simultaneamente. A necrose abrange alterações regressivas reversíveis que, em algum ponto e por algum estímulo descohecido, passam a ser irreversíveis. Instalada a irreversibilidade e a necrose propriamente dita, inicia-se um processo de desintegração celular (autólise).

Apoptose – também designada por morte celular programada é um tipo de auto-destruição celular que requer energia e síntese proteica para a sua execução. Está relacionada com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose. Portanto consiste numa morte desejável e necessária que participa na formação dos órgãos.

Autofagia – neste processo, a célula elimina organelos envelhecidos através da formação de autofagossomas. O objectivo deste processo é converter os componentes da célula em alimento para prolongar a sobrevivência do organismo.

Morte autofágica – induzida em algumas células, é considerada uma morte celular programada e associada a células isoladas.

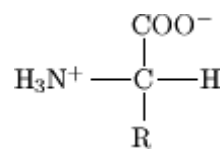
5. Organização molecular



Capítulo 2 – Componentes químicos celulares e Macromoléculas

1. Aminoácidos

Um aminoácido é qualquer molécula que contém simultaneamente grupos funcionais amina e ácido carboxílico.



Um aminoácido é constituído por:

- ✚ Carbono α
- ✚ Grupo amina
- ✚ Grupo carboxilo
- ✚ Átomo de hidrogénio
- ✚ Cadeia lateral radical que influencia:
 - O ponto isoeléctrico do aminoácido;
 - O próprio aminoácido (porque varia de aminoácido para aminoácido);
 - O tipo de aminoácido formado quanto à polaridade, porque existem aminoácidos apolares, polares neutros ou polares com carga.

Os aminoácidos apresentam um determinado estado de ionização que se encontra dependente do pH do meio. Assim, podem existir na forma ionizada – **ião dipolar ou zwitterião** – que para um determinado valor de pH, tantas cargas positivas como negativas. Este valor é designado por **ponto isoeléctrico**.

Quando o pH do meio é básico (pH do meio superior ao ponto isoeléctrico), o aminoácido comporta-se como um ácido, ficando carregado negativamente, por perda de protões.

Quando o pH do meio é ácido (pH do meio inferior ao ponto isoeléctrico), o aminoácido comporta-se como uma base, ficando carregado positivamente, por ganho de protões.

Aminoácidos essenciais – são aqueles que não existem no nosso organismo, tendo portanto que ser obtidos através da alimentação. São todos da forma L, excepto os que são da forma D (alguns antibióticos e nas paredes das bactérias).

2. Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono (ou glícidos) são substâncias sintetizadas pelos organismos vivos.

Têm função energética e estrutural pois participam da arquitectura corporal dos seres vivos. Para além disso, também têm função anticoagulante, lubrificante e participam na sinalização celular.

A fórmula geral da estrutura dos hidratos de carbono é $(CH_2O)_n$, sendo que cada um deles possui na sua estrutura:

-  Grupo aldeído (CHO) – aldose
-  Grupo cetona (C = O) – cetose

Os hidratos de carbono podem dividir-se em: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos.

Os **monossacarídeos** ou açúcares simples constituem as moléculas dos carboidratos, as quais são relativamente pequenas, insolúveis em água e não hidrolisáveis. Em geral, obedecem à fórmula básica dos hidratos de carbono.

Os **oligossacarídeos** ou açúcares pequenos são constituídos por duas a dez moléculas de monossacarídeos, como os dissacarídeos que têm duas. (Ex.: maltose, lactose e sacarose.)

Os **polissacarídeos** ou açúcares múltiplos são formados pela união de mais de dez moléculas monossacarídeas, constituindo, assim, um polímero de monossacarídeos, geralmente de hexoses. Ao contrário dos anteriores, são insolúveis em água, não alterando assim o equilíbrio osmótico das células e prestando-se muito bem às funções de armazenamento e reserva nutritiva. (Ex.: celulose, amido e glicogénio.)

3. Lípidos

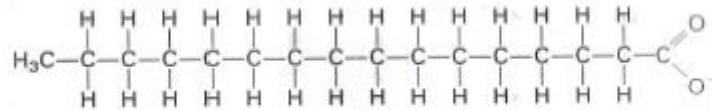
Os lípidos (ou lípideos) são biomoléculas insolúveis em água, e solúveis em solventes orgânicos, como o álcool, benzina, éter ou clorofórmio.

A maioria dos lípidos são moléculas anfipáticas, isto é, possuem uma cabeça que é polar ou hidrofílica, e uma cauda constituída por uma parte apolar ou hidrofóbica, isto é, que repele a água. Assim, de todos os lípidos enunciados acima, apenas os triglicerídeos não são moléculas anfipáticas.

3.1. Ácidos Gordos

Os ácidos gordos são ácidos monocarboxílicos de cadeia normal hidrocarbonatada e que possuem um grupo carboxílico (COOH) que permite a ligação a outras moléculas. São armazenados no citosol sob a forma de gotículas de gordura, os triglicerídeos.

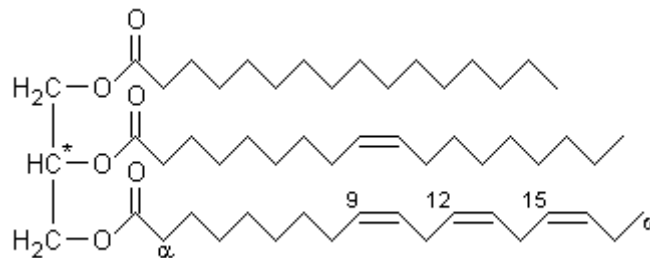
Ao longo de uma cadeia hidrocarbonatada de um ácido gordo, existe sempre uma ligação dupla que lhe confere uma quebra extremamente importante para as membranas biológicas.



3.2. Triglicerídeos (ou Triacilgliceróis)

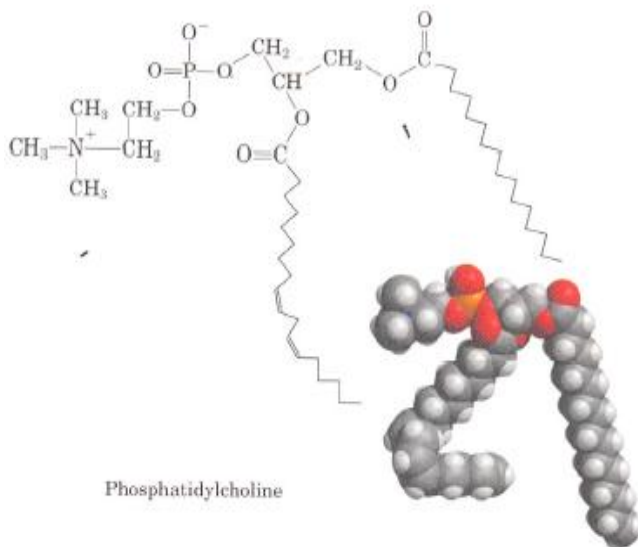
Os triglicerídeos são lípidos formados pela ligação de três moléculas de ácidos gordos com uma de glicerol, através de ligações éster. Normalmente, os ácidos gordos que participam na estrutura de um triglicerídeo são diferentes entre si.

Quando necessário, os ácidos gordos são libertados das moléculas de triglicerídeos e quebrados em unidades com dois átomos de carbono.



3.3. Fosfoglicerídeos / Fosfolípidos

Os fosfoglicerídeos são lípidos constituídos por uma molécula de glicerol, duas cadeias de ácidos gordos (uma saturada e uma insaturada), um grupo fosfato e uma molécula polar ligada a ele (serina, etanolamina, colina ou inositol). Assim, a sua designação depende da molécula polar presente (Ex.: serina – fosfatidilserina).



As suas principais funções são no processo de sinalização celular e na constituição das membranas biológicas → Cada membrana é constituída por uma dupla camada fosfolipídica organizada de modo a que as cabeças hidrofílicas fiquem viradas para o lado exterior da membrana e as caudas hidrofóbicas para o interior. Esta organização permite tornar a membrana selectiva pois só atravessam a membrana por difusão simples as substâncias lipossolúveis.

3.4. Esfingolípidos

Os esfingolípidos provêm da esfingosina que é um aminoálcool, e cujo grupo amina se pode ligar a um ácido gordo formando a ceramida. Existem dois tipos de esfingolípidos:

- + **Esfingofosfolípidos** – são as ceramidas que contêm fosfato. Um exemplo é a esfingomielina que é o componente principal da mielina das células nervosas. São constituídos por:
 - Fosfocolina ou Fosfoetanolamina
 - Ceramida
- + **Glicolípidos** – são as ceramidas que contêm açúcares. Podem ser de dois tipos:
 - Cerebrosídeos – constituídos por ceramida e 1 a 4 moléculas de açúcar
 - Gangliosídeos – constituídos por ceramida e n moléculas de açúcar (contém, para além de outras moléculas, o ácido N-acetilneuramínico).

Nos animais, os glicolípidos são derivados da ceramida, enquanto que nas plantas são derivados do glicerol. Assim, nas membranas das células animais:

- + **Camada interna** – fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina
- + **Camada externa** – fosfatidilcolina e esfingomielina

Nota: A fosfatidilserina é uma molécula negativa, sendo importante porque dificulta ou facilita a passagem de determinado tipo de moléculas.

3.5. Glicolípidos / Grupos sanguíneos

Antigénios O – Glicose + Galactose + N-Acetilgalactoseamina + Galactose + ...

Antigénios A – Antigénio O + N-Acetilgalactoseamina

Antigénios B – Antigénio O + Galactose

4. Nucleótidos

Os nucleótidos são compostos ricos em energia que auxiliam os processos metabólicos na maioria das células. São constituídos por:

- + Uma base azotada (purina / pirimidina)
- + Uma pentose (ribose / desoxirribose)
- + Um ou vários grupos fosfato

As principais funções dos nucleótidos são:

- + Transferência de sinais químicos (ex.: CoA)
- + Constituição de ácidos nucleicos

- ✚ Constituição de moléculas que permitem efectuar o armazenamento de energia (ex.: ATP)
- ✚ Controlo das reacções intermoleculares (ex.: AMP cíclico)

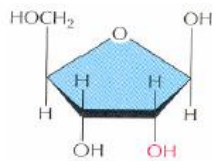
⇒ Bases azotadas

Purinas – Adenina (A) e Guanina (G)

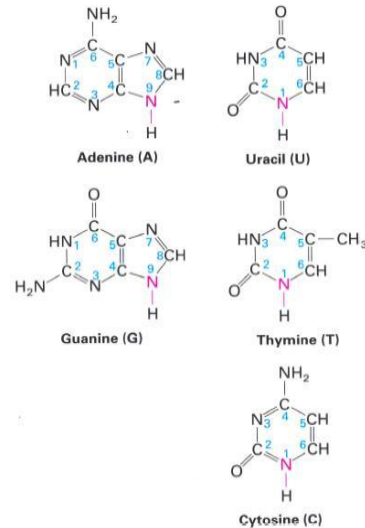
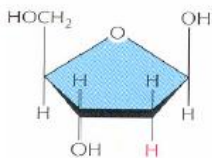
Pirimidinas – Uracilo (U), Timina (T) e Citosina (C)

⇒ Pentoses

✚ β-D-Ribose



✚ β-D-Desoxirribose



Nota:

Nucleótido – base + pentose + fosfato

Nucleósido – base + pentose

Base	Nucleósido
Adenina	Adenosina (A)
Guanina	Guanosina (G)
Citosina	Citidina (C)
Timina	Timidina (T)
Uracilo	Uridina (U)

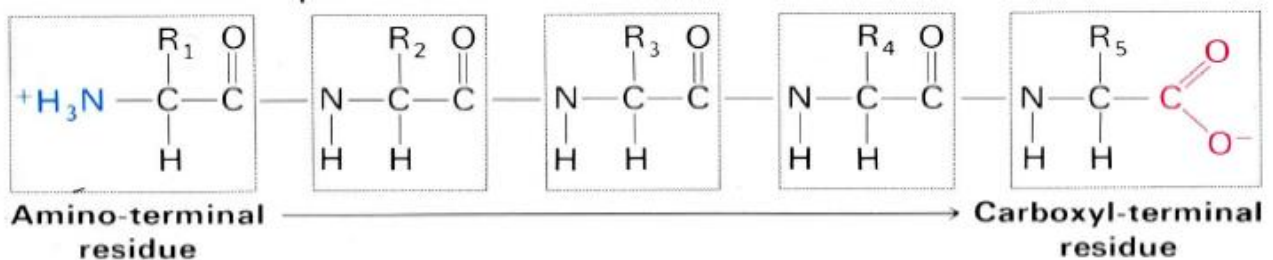
5. Proteínas

As proteínas são compostos orgânicos de estrutura complexa, sintetizadas pelos organismos vivos através da condensação de um grande número de moléculas, através de ligações peptídicas.

⇒ Ligação peptídica

As ligações estabelecidas entre aminoácidos numa determinada proteína denominam-se ligações peptídicas e estabelecem-se entre o grupo carboxilo de um aminoácido e o grupo amina do aminoácido seguinte. Estas ligações podem ser quebradas por enzimas ou através de tratamentos drásticos como a adição de ácidos ou bases fortes a temperaturas elevadas, pelo facto de serem ligações extremamente fortes.

Tendo por base o mecanismo de ligação conclui-se que o primeiro aminoácido da cadeia polipeptídica tem o grupo amina livre e o último tem o grupo carboxílico livre.



⇒ Composição

Quanto à sua composição molecular, as proteínas podem ser classificadas em:

- ✚ **Simples** – proteínas constituídas unicamente por aminoácidos
- ✚ **Conjugadas** – proteínas que apresentam a cadeia de aminoácidos ligada a um radical diferente (grupo prostético). Dependendo do grupo prostético, as proteínas podem ser classificadas em:
 - Glicoproteínas – glícido (ex.: mucina)
 - Cromoproteínas – pigmento (ex.: hemoglobina)
 - Fosfoproteínas – ácido fosfórico (ex.: vitelina)
 - Nucleoproteínas – ácido nucleico
 - Lipoproteínas – lípido

⇒ Forma

Quanto à sua forma, as proteínas podem ser classificadas em:

- ✚ **Globulares** – presentes no sangue e solúveis em água, com estrutura compacta, o que permite o transporte de lípidos
- ✚ **Fibrosas** – proteínas estruturais, cuja forma se define segundo um eixo, sendo insolúveis em água (ex.: colagénio)

⇒ Estrutura

✚ **Primária** – é dada pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. É o nível estrutural mais simples e mais importante, por ser dele que deriva todo o arranjo espacial da molécula. Esta estrutura é específica para cada proteína, sendo determinada geneticamente. Como a sua constituição só é definida pela sequência de aminoácidos, a orientação espacial da molécula não tem qualquer relevância.

✚ **Secundária** – é dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína. É o último nível de organização das proteínas fibrosas, mais simples estruturalmente. Esta estrutura ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos dos aminoácidos e os seus grupos amina e carboxilo. Existem dois tipos de estrutura secundária:

- α – define-se entre pequenas zonas da cadeia entre aminoácidos adjacentes.
- β – estabelecimento de pontes de hidrogénio entre diferentes cadeias peptídicas.

✚ **Terciária** – resulta do enrolamento da proteína no espaço, sendo mantida por pontes de hidrogénio e pontes dissulfito. Basicamente, esta estrutura confere actividade biológica à proteína. Enquanto a estrutura secundária é determinada pelo relacionamento estrutural de curta distância, a terciária é caracterizada pelas interações de longa distância entre aminoácidos.

Os aminoácidos apolares vão dispôr-se essencialmente no interior da molécula, porque têm de existir grupos polares à superfície para permitirem a dissolução em água.

A estrutura terciária é, então, determinada e estabilizada por determinados factores como:

- Interacções hidrofóbicas – tendência dos aminoácidos apolares “fugirem” da água.
- Ligações iónicas – forças de atracção entre aminoácidos com radicais carregados com cargas opostas.
- Forças de van der Waals
- Pontes de hidrogénio – ligações com tratamentos fracos que podem ser quebradas porque são covalentes.
- Ligações dissulfito – ligações não covalentes que resultam da oxidação, permitindo que duas cisteínas (aminoácidos não carregados) possam reagir entre si.

✚ **Quaternária** – existente nas moléculas com várias cadeias polipeptídicas. Depende da forma como as várias cadeias se organizam entre si, sendo que as interações são as mesmas da estrutura terciária.

⇒ Desnaturação de proteínas

A desnaturação consiste na perda de actividade biológica da proteína devido à quebra das ligações não covalentes e das pontes dissulfureto, que asseguravam a manutenção da sua estrutura terciária e

quaternária. No entanto, durante a desnaturação, a estrutura primária da proteína não se altera, ou seja, a sequência linear dos aminoácidos mantém-se constante.

Os **agentes desnaturantes** mais comuns são:

- **Ureia** – agente desnaturante que corta as ligações não covalentes (ligações hidrofóbicas).
- **β -mercaptoetanol** – agente redutor que corta as pontes dissulfito.

Através de um ensaio enzimático, foi concluído que a conformação de uma proteína está na sequência dos aminoácidos, ou seja, se a estrutura primária não for mantida, a proteína não volta a ter actividade.

A **diálise** consiste na remoção dos agentes desnaturantes, permitindo que a proteína volte a adquirir a sua conformação nativa, readquirindo a sua actividade biológica (**renaturação**). No caso da proteína ser constituída por apenas uma cadeia peptídica, a actividade biológica é restabelecida quando a sua estrutura terciária é a correcta. Caso a proteína seja constituída por mais do que uma cadeia peptídica, ela só volta a adquirir a sua actividade biológica quando se apresenta na correcta estrutura quaternária.

Não ocorre renaturação caso os agentes desnaturantes utilizados tenham sido:

- Enzimas (proteases)
- Meios de pH muito ácido ou muito básico, quando associados a temperaturas da ordem dos 180°C.

5.1. Enzimas

- ✚ São específicas
- ✚ Apresentam um local activo para ligação do substrato
- ✚ Podem ou não ter um local alostérico
- ✚ Podem sintetizadas sob a forma de zimogénio
- ✚ Podem ter necessidade de coenzimas
- ✚ Não se consomem nas reacções
- ✚ São a maior e mais específica classe de proteínas

Local activo da enzima – local de ligação da enzima ao substrato.

Local alostérico – local de ligação da molécula efectora que pode activar ou inibir a enzima.

Coenzima – enzima inicialmente inactiva (sintetizada no organismo), e que para se tornar activa tem que sofrer proteólise.

Zimogénios – são formas precursoras das enzimas (forma inactiva) que também têm que sofrer proteólise para se tornarem activas.

Constante de Michaelis (K_m) – valor de concentração de substrato para o qual a velocidade da reacção atinge metade do valor máximo. Se K_m for um valor baixo significa que a enzima é muito específica, e que se liga fortemente ao substrato. Se o valor de K_m for elevado pode concluir-se que a enzima é pouco específica e que o substrato não se liga muito fortemente à enzima.

Quanto mais substrato se adicionar à enzima, maior a velocidade de produção do produto da reacção. Quando a enzima entra em saturação, a velocidade de formação de produtos estabiliza.

⇒ **Modos de actuação das enzimas**

- ✚ **Modelo chave-fechadura** – o substrato encaixa perfeitamente no local activo da enzima, havendo uma total complementaridade entre ambos.
- ✚ **Modelo do encaixe induzido** – o substrato e o local activo têm conformações diferentes. O substrato induz uma alteração na **conformação** do local activo da enzima.
- ✚ **Inibição** – o centro activo não está apto para ligar-se a nenhum substrato. Se no local alostérico se ligar um efector positivo, induz-se uma alteração da conformação do local activo, que passa a poder ligar-se ao substrato. Se no local alostérico se ligar um efector negativo (inibidor), o local activo não vai permitir que nenhum substrato se ligue.

5.2. **Anticorpos**

Anticorpos policlonais – população total de imunoglobulinas presentes num soro animal. São anticorpos que são sintetizados num animal, mas que reconhecem diferentes partes da proteína antigénica (diferentes determinantes antigénicos ou epítomos). Este tipo de anticorpos reconhecem sempre o antígeno, mesmo que este esteja sob a forma desnaturada.

Anticorpos monoclonais – um tipo de imunoglobulinas sintetizadas por um único clone (célula) e que é específica para um único determinante.

Epítomos – são sequências de aminoácidos relacionadas com a estrutura primária.

- ✚ Epítomos conformacionais – a proteína quando está no seu estado nativo, vai adquirir uma determinada conformação (estrutura terciária).
- ✚ Estruturas moleculares derivadas de modificações pós-tradução – estas modificações é que podem vir a conferir um reconhecimento aos anticorpos e permitir a activação das proteínas (ex.: glicoproteínas, adição de fosfatos, etc.)

Imunogénio – qualquer substância capaz de induzir uma resposta imunitária.

Imunoglobulina – proteína complexa, constituída por vários domínios (estrutura quaternária). Possui duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, ligadas por pontes dissulfureto.

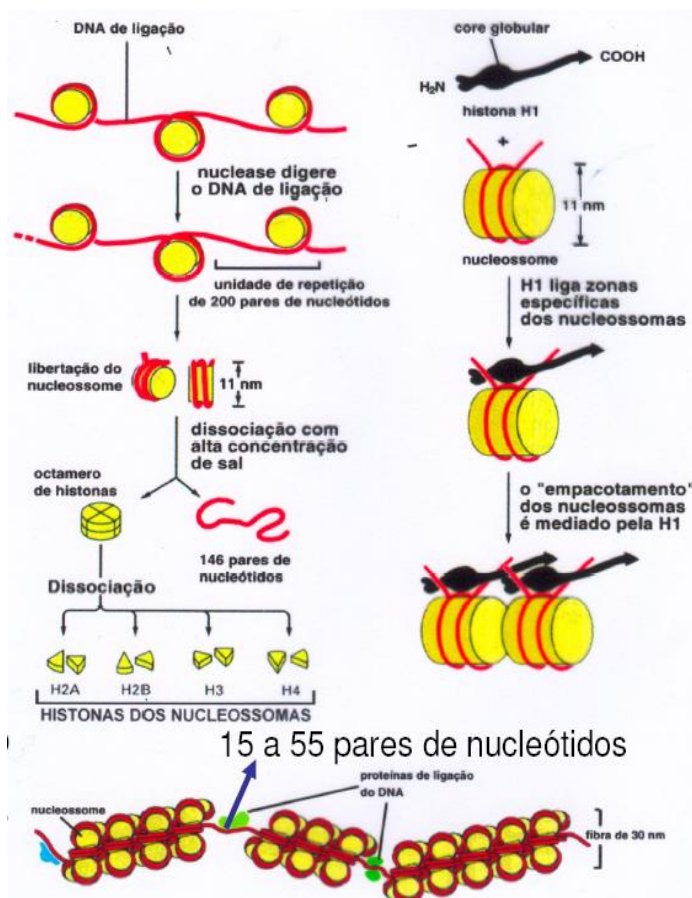
6. **Ácidos nucleicos**

Os ácidos nucleicos são ácidos orgânicos complexos formados por uma longa cadeia de nucleótidos, presente no núcleo e, por vezes, no citoplasma das células vivas. Os dois tipos, DNA e RNA, constituem a base da hereditariedade. Os nucleótidos, à medida que se vão organizando na cadeia de ácido nucleico constituem o código genético.

6.1. Ácido desoxirribonucleico (DNA)

- ✚ Dupla hélice (2 cadeias);
- ✚ Cadeias antiparalelas;
- ✚ Cadeias complementares (numa cadeia temos uma purina e noutra temos uma pirimidina): C $\equiv$ G , A = T;
- ✚ Os nucleótidos ligam-se entre si por ligações fosfodiéster;
- ✚ A estabilidade é devida às ligações entre as bases: ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e existência da dupla cadeia.
- ✚ A base azotada liga-se ao carbono 1' da respectiva pentose através de uma ligação glicosídica.
- ✚ A molécula de DNA possui um esqueleto constituído por desoxirribose+fósforo, sendo que as bases azotadas se encontram no seu interior.
- ✚ A síntese de DNA faz-se sempre da extremidade 5' para a 3' da cadeia.
- ✚ Um **gene** é uma porção de DNA que dá origem a uma molécula de RNA funcional.

⇒ Nucleossomas e a fibra de 30 nm

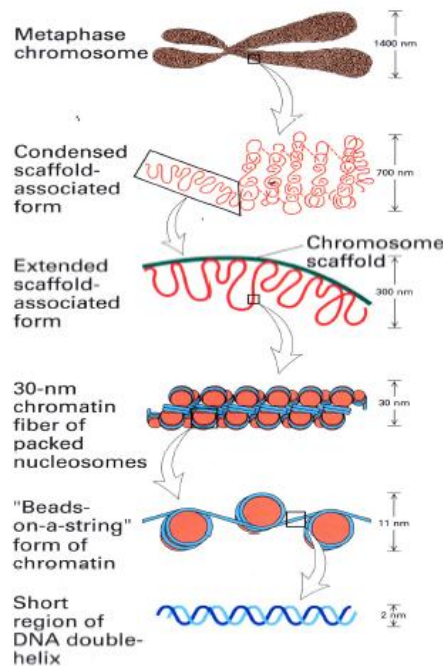


A cromatina nos núcleos encontra-se organizada estruturalmente, e a um nível básico, em subunidades com a forma de esferas, com diâmetro de 10 nm, designadas por **nucleossomas**. Estes são proteínas carregadas positivamente, na medida em que o DNA tem grupos fosfato carregados negativamente.

O estudo estrutural detalhado mostra que cada nucleossoma é constituído por um esqueleto central proteico, constituído pelo octâmero de histonas 2x (H2A, H2B, H3 e H4), em torno do qual o DNA se enrola duas vezes, sendo este duplo enrolamento estabilizado por uma outra quinta histona (H1). O comprimento do DNA corresponde a 146 pares de bases nucleotídicas.

As **histonas** são proteínas altamente conservadas, ricas em aminoácidos carregados positivamente. Desta forma, significa que não sofreram quaisquer alterações durante a evolução.

⇒ Níveis de compactação da molécula de DNA



Os nucleossomas são o primeiro nível de compactação do DNA. O nível seguinte consiste na concentração dos nucleossomas justapostos, com enrolamento helicoidal posterior, formando uma longa fibra de 30 nm. As histonas, com a sua forma alongada, interactivam contribuindo assim para a aproximação dos nucleossomas e para a sua justaposição.

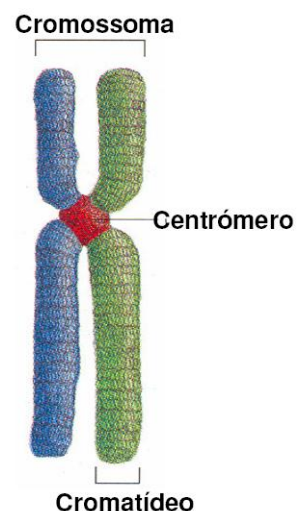
Com o prosseguimento do ciclo celular, a fibra de cromatina organiza-se em níveis, sucessivos de complexidade, ainda hoje pouco esclarecidos, até formar o corpo do cromossoma em metafase. Este é constituído, de acordo com a hipótese mais aceite actualmente, por uma única fibra de cromatina, composta por uma longa molécula de DNA, que percorre cada cromátídeo de um extremo ao outro.

⇒ Cromossomas

Um cromossoma é uma molécula de DNA associada a proteínas histónicas e não histónicas. É constituído por dois **cromátídeos** ligados pelo **centrómero** que se caracteriza por ser uma zona altamente compacta.

Para que um cromossoma seja funcional, tem de possuir:

- ✚ Origem de replicação – local onde se inicia a replicação do DNA;
- ✚ Centrómero – região especializada e complexa dos cromossomas que apresenta poucos ou nenhuns genes. É o ponto de união dos cromátídeos irmãos e contém uma estrutura (o cinetocoro) a que as fibras do fuso se ligam durante a mitose e a meiose, pelo que tem um papel importante no movimento dos cromossomas em direcção aos pólos;



✚ **Telómero** – sequências de DNA existentes nas zonas terminais dos cromossomas, que impedem um encurtamento de DNA pela acção de uma enzima específica. O telómero pode ter o comprimento de algumas centenas de pares de bases e participa na estabilidade e na replicação do cromossoma. Um cromossoma normal possui dois telómeros. A enzima que “protege” os telómeros designa-se telomerase, que já não está presente na maioria das células adultas. Nas células embrionárias, existe sempre a telomerase, na medida em que estão em constante desenvolvimento.

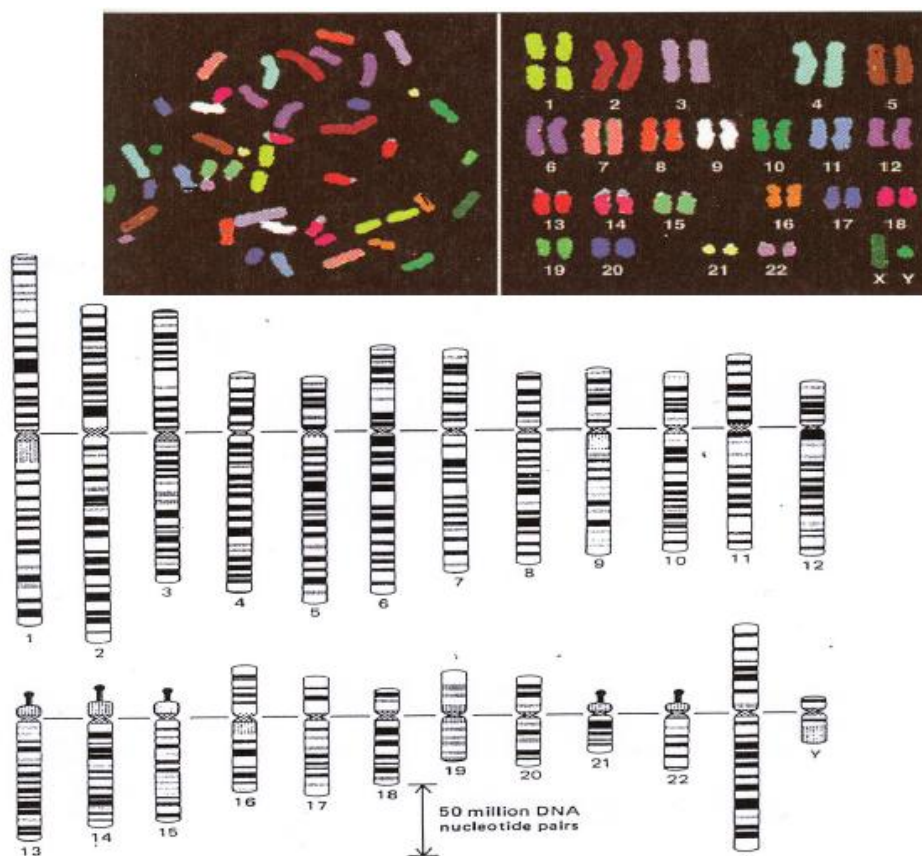
O genoma humano contém 23 pares de cromossomas, logo existem 46 moléculas de DNA.

⇒ Cariótipo

O cariótipo é o conjunto dos cromossomas duma célula eucariótica, normalmente definido em termos do seu número, dimensões e morfologia (forma e estrutura). É característico de cada espécie como, por exemplo, o cariótipo humano. Este é constituído por 22 pares de cromossomas homólogos (autossomas) e um par de cromossomas sexuais (heterossomas).

Bandas G – possuem baixo teor em GC (guanina + citosina) e são escuras devido à coloração de Giemsa.

Bandas R – elevado teor em GC e apresentam cor mais clara. Correspondem a zonas com maior densidade de genes, especialmente genes que são expressos em todos os tipos de células.



Politinização – há repetição da molécula de DNA mas não há separação. Existe o cromossoma *polytene* e é por isso que se consegue observar ao MOC.

⇒ Cromatina

Nas células eucarióticas, a parte não nucleolar do núcleo é formada, na sua maior parte, por uma estrutura fibrosa, a que se dá o nome de cromatina. Esta é constituída por DNA associado a uma quantidade igual de proteínas básicas, as histonas, e proteínas não histónicas.

A cromatina no núcleo em interfase está topologicamente compartimentada em domínios estruturais correspondentes a cada cromossoma e territórios, como por exemplo, os dos centrómeros e os dos telómeros.

Existem dois tipos de cromatina:

- ✚ **Eucromatina** – é a cromatina activa e a zona geneticamente mais activa do genoma, estando nela situadas as regiões do DNA com uma hipersensibilidade marcada à DNAase. Esta cromatina situa-se no interior do nucleoplasma.

- ✚ **Heterocromatina** – corresponde às regiões menos activas e inactivas do genoma, tem uma estrutura condensada e mantém o seu grau de condensação durante todo o ciclo celular. Localiza-se ao longo do interior do invólucro nuclear e junto dos poros nucleares.

- Facultativa – segmentos cromossómicos ou cromossomas inteiros que durante o período precoce do desenvolvimento embrionário se inactivam e condensam, continuando neste estado em todos os tecidos ou em muitos deles – ex.: um dos cromossomas X das células femininas.

- Constitutiva – caracteriza-se por ser constituído por sequências que se encontram altamente repetidas e organizadas lado a lado (em *tandem*). Assim, encontra-se em posições idênticas nos cromossomas homólogos.

6.2. Ácido ribonucleico (RNA)

- ✚ Possui, normalmente, uma cadeia simples e linear, mas que pode sofrer emparelhamento sobre si (por emparelhamento de bases), originando conformações espaciais mais complexas;

- ✚ Envolvido na síntese de proteínas;

- ✚ Consiste num grande número de nucleótidos unidos, cada um dos quais compreende o açúcar ribose, um grupo fosfato e uma de quatro bases azotadas;

- ✚ Existe em três formas principais, cada uma delas com função diferente na síntese das proteínas: mRNA, tRNA e rRNA.

⇒ RNA de transferência (tRNA)

- Pequena molécula de RNA que se combina com um aminoácido específico e o transporta para o ribossoma durante a síntese de proteínas;
- Tem uma estrutura tridimensional específica;
- Inclui um tripleto de bases numa das extremidades (o **anticodão**) que é complementar de um outro conjunto de 3 nucleótidos do mRNA (o **codão**);
- Na extremidade 3' tem o codão ACC que é o local onde se vai ligar o aminoácido;
- Os nucleósidos modificados são: pseudouridina, dihidrouridina, inosina e ribotimidina.

⇒ RNA mensageiro (mRNA)

- Cadeia linear;
- Sintetizado no núcleo;
- Possui uma sequência de 3 nucleótidos (**codão**), complementar do anticodão do tRNA;
- Actua como molde para a ligação de aminoácidos ao nível do ribossomas durante a síntese das proteínas.

⇒ RNA ribossômico (rRNA)

- Está presente nas subunidades dos ribossomas;
- Pode formar estruturas complexas, semelhantes a ganchos e ansas, estabilizados pelo emparelhamento de bases;
- Todo o rRNA (5S, 5.8S, 28S e 18S) é sintetizado no nucléolo, excepto a fracção 5S que é sintetizada no nucleoplasma;
- O **poliribossoma** existe nas células quando há síntese de proteínas citosólicas.
- As **ribozimas** são moléculas de RNA com funções catalíticas que permitem o corte de determinadas zonas de moléculas de RNA.

⇒ Ribossomas

- Constituídos por RNA associado a proteínas;
- São constituídos por duas subunidades (uma maior e outra menor);
- Nos **procarióticos**, os ribossomas são do tipo **70S**, em que a subunidade maior é uma 50S e a subunidade menor é uma 30S.
- Nos **eucarióticos**, os ribossomas são do tipo **80S**, em que a subunidade maior é uma 60S (que está associada a 49 proteínas) e a subunidade menor é uma 40S (que está associada a 33 proteínas). A subunidade maior é constituída por 3 fracções (5S, 5.8S e 28S) e a subunidade menor é constituída por 1 fracção (18S).

⇒ Código genético

O código genético é a informação para a construção das proteínas, inscrita no material genético. Não tem vírgulas na sua escrita, ou seja, é lido na totalidade, sem quaisquer interrupções. Apresenta as seguintes características:

- + Degenerado – existem várias codões que codificam o mesmo aminoácido;
- + Universal – é lido da mesma maneira, desde as bactérias até aos mamíferos (com exceção das mitocôndrias, nas quais há algumas variações no modo de leitura);
- + Possui $4^3 = 64$ codões;
- + Existem 3 codões stop ou de terminação, para os quais não há nenhum anti-codão complementar, sendo responsáveis por sinalizar o fim do processo de tradução (UAG, UGA, UAA);
- + Existe um codão de iniciação que codifica a metionina e que sinaliza o início do processo de tradução (AUG).

Capítulo 3 – Métodos de estudo das células

1. Centrifugação

Na centrifugação, o comportamento de uma partícula num campo de centrifugação, depende do seu peso e da resistência que encontra ao mover-se no meio da suspensão.

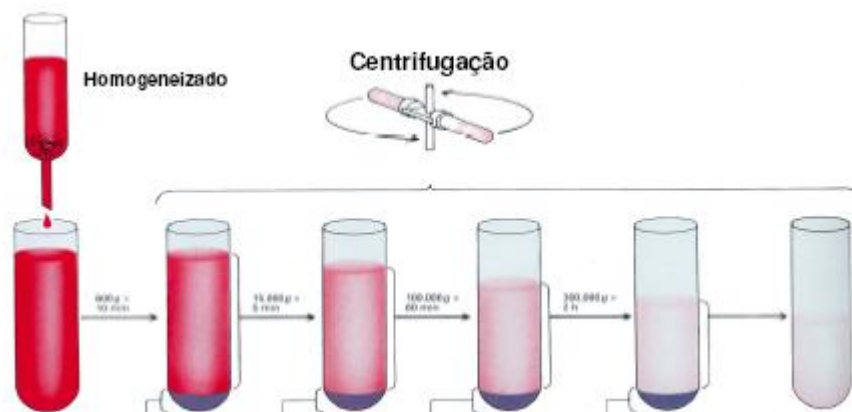
A taxa de sedimentação é:

- ✚ Directamente proporcional ao tamanho da partícula;
- ✚ Directamente proporcional à diferença entre a densidade da partícula e a densidade do meio;
- ✚ Nula quando a densidade da partícula iguala a do meio;
- ✚ Inversamente proporcional à viscosidade.
- ✚ Directamente proporcional à força centrífuga.

1.1. Centrifugação Diferencial ou Fraccionada

Consiste em aumentar progressivamente o tempo de centrifugação e a força centrífuga, de modo a que se separem diferentes compostos, sucessivamente menos densos.

No caso da centrifugação diferencial de uma célula previamente homogeneizada, primeiro sedimentam os núcleos (zonas mais densas da célula); depois (com aumento da força centrífuga e do tempo de centrifugação) sedimentam mitocôndrias, cloroplastos, lisossomas e peroxissomas; posteriormente sedimenta a membrana plasmática, fracções microssomais e polirribossomas; em seguida, depositam-se ribossomas e o que resta são as porções solúveis do citoplasma.



1.2. Centrifugação Contragradiente

A separação depende da densidade da partícula. As partículas vão movimentar-se até atingir uma densidade igual à do meio. É uma centrifugação isopírica porque a densidade é rigorosa, o que obriga a um maior cuidado com a velocidade e com o tempo de centrifugação.

Isto acontece pois se aumentarmos muito estes factores, todas as partículas acabam por sedimentar. Nesta experiência, utiliza-se um meio com um gradiente de concentração em sacarose, sendo que as partículas que se encontram mais no fundo do tubo têm maior concentração de sacarose.

⇒ Centrifugação por densidade moderada

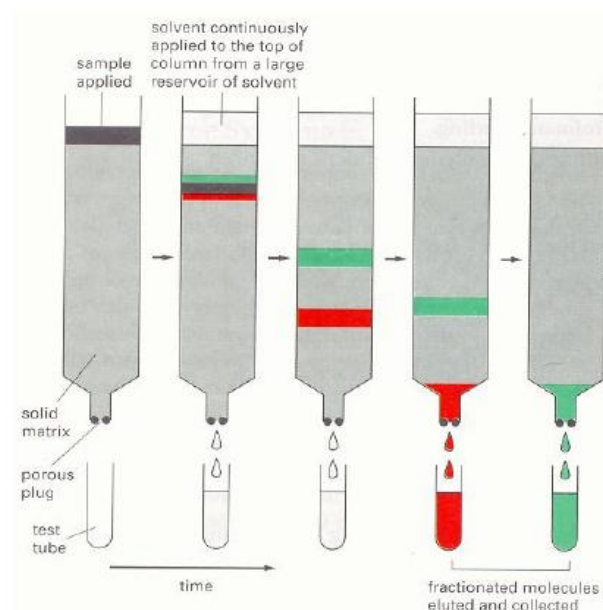
Aqui, efectua-se a separação por tamanho por e densidade, em que a zona de maior densidade tem uma densidade menor que a partícula a separar. Assim, o tempo e a velocidade de centrifugação têm de ser controlados cuidadosamente.

⇒ Centrifugação isopícnica

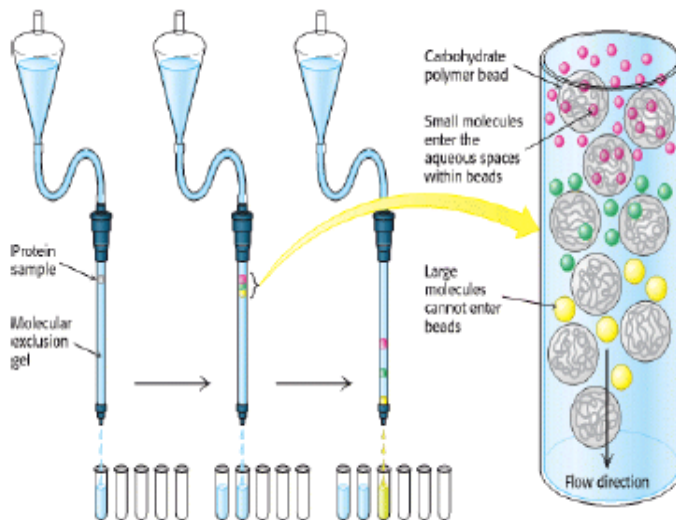
Nesta centrifugação, a separação é efectuada apenas por densidade, sendo que a zona de maior densidade tem uma densidade maior que a partícula a separar.

2. Cromatografia

A cromatografia é um método de purificação de proteínas. Neste método, é utilizada uma coluna cheia com uma matriz com características específicas de acordo com o tipo de cromatografia que se vai realizar. No cimo da coluna, coloca-se a amostra que é equilibrada com um tampão. Este tampão vai atravessando a coluna e à medida que isto acontece, a amostra vai descendo ao longo da mesma.



2.1. Cromatografia de filtração por gel



Nesta cromatografia, utiliza-se uma matriz inerte e porosa para que se possam separar as proteínas pelo seu tamanho e peso molecular.

As proteínas de grande peso molecular não entram nos poros e são eluídas em primeiro lugar. As proteínas mais pequenas penetram tanto mais profundamente nos poros, quanto mais pequenas forem, e necessitam de maiores quantidades de tampão para serem eluídas da coluna.

Para concluir se uma determinada proteína se encontra num determinado líquido recolhido, procede-se a uma espectrofotometria a 280 nm.

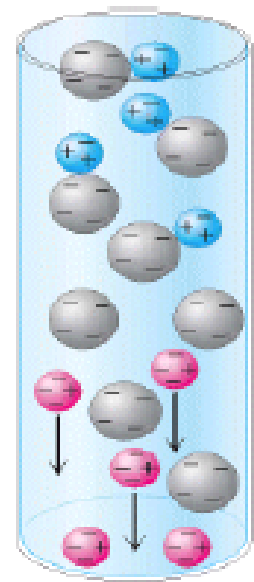
2.2. Cromatografia de troca iónica

Nesta cromatografia, as proteínas são separadas de acordo com a sua carga. Utilizam-se colunas que são carregadas positiva ou negativamente, atraindo as proteínas de carga negativa ou positiva, respectivamente.

Quando uma coluna tem carga positiva, atraindo proteínas com carga negativa, diz-se que ocorre uma **troca aniónica**. Quando a coluna possui carga negativa, atraindo proteínas carregadas positivamente, diz-se que ocorre uma **troca catiónica**.

As proteínas de carga contrária à matriz são atraídas por ela, sendo retardadas relativamente a outras que não sejam atraídas pela matriz, e que vão ser eluídas em primeiro lugar.

A eluição da proteína vai ser efectuada por uma solução tampão, cujo pH altere a carga da proteína, de acordo como o seu ponto isoelectrico. Podemos dar o exemplo de uma troca aniónica (proteína carregada negativamente e coluna carregada positivamente). Se adicionarmos uma solução com um pH muito baixo (abaixo do ponto isoelectrico da proteína), a proteína tem que funcionar como uma base, aceitando H^+ e ficando carregada positivamente. Neste caso, a proteína deixa de ter afinidade com a matriz e é eluída.



3. Electroforese (em gel de poliacrilamida)

A electroforese é um método de separação e caracterização de proteínas. A acrilamida é uma substância neurotóxica que vai reagir com a N,N'-metileno-biscarilamida, formando uma rede porosa: a poliacrilamida. Quanto maior a concentração de poliacrilamida, mais finos serão os poros (que permitem separar as proteínas pelos seus pesos moleculares). Para além da poliacrilamida, também podem utilizar-se como suporte a nitrocelulose (usada em análises críticas) ou a agarose.

Basicamente, a electroforese é um método útil para estudar patologias, para efectuar testes de controlo da qualidade e para verificação de doenças.

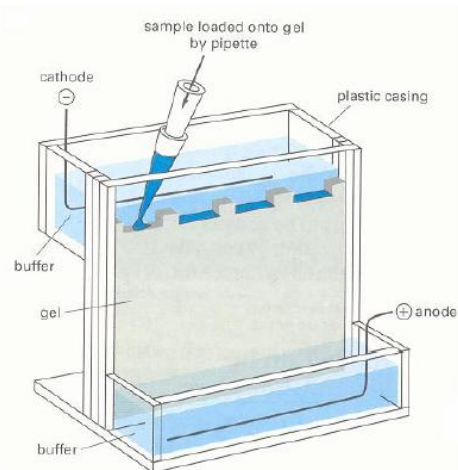
⇒ Electroforese nativa (PAGE)

Nesta electroforese, não é utilizado nenhum desnaturante, sendo que as proteínas se movimentam e são separadas tendo em conta a massa e a carga (ponto isoeléctrico).

⇒ Electroforese com desnaturante (SDS-PAGE)

Nesta electroforese, utiliza-se um detergente – o SDS (sódiododecilsulfato) que é fortemente aniónico, logo vai desnaturar as proteínas e fazer com que elas adquiram carga negativa. Por vezes, juntamente com o SDS pode utilizar-se um agente redutor (β -mercaptoetanol) que tem a capacidade de quebrar as pontes dissulfureto da proteína.

As proteínas são colocadas no tanque de electroforese, misturadas com o SDS. Como adquirem carga negativa, são atraídas para o pólo positivo que está situado no lado oposto do tanque. Neste processo, as proteínas migram ao longo do gel de poliacrilamida de acordo com o seu peso molecular, sendo que quanto mais pequenas forem, mais rapidamente vão descer ao longo do tanque, ficando mais próximas do pólo positivo (neste caso, as proteínas migram ao contrário da cromatografia em gel, sendo que as proteínas mais pequenas são recolhidas em primeiro lugar).



Depois de realizar a electroforese, fixam-se as proteínas ao gel com ácidos ou álcoois e procede-se à sua coloração.

Na coloração, podem utilizar-se três substâncias diferentes:

- ✚ Azul de Comassie
- ✚ Nitrato de prata – é mais sensível que o anterior porque detecta proteínas mais pequenas.
- ✚ Específicas – no caso de as proteínas serem enzimas.

⇒ Focagem isoelétrica

A focagem isoelétrica permite separar as proteínas segundo a sua carga, sendo útil para determinar rigorosamente o ponto isoelétrico de uma dada proteína. Como se analisa a carga, o meio de suporte pode ser a poliacrilamida ou a agarose.

O gel usado possui **anfólitos** que são moléculas cujo ponto isoelétrico é conhecido. Assim, neste método, é necessário aplicar uma corrente elétrica para que os anfólitos se desloquem e criem um gradiente de pH. Estes anfólitos devem possuir um conjunto de características:

- ✚ Condutividade no ponto isoelétrico;
- ✚ Inertes com as proteínas em estudo;
- ✚ Capacidade tampão para não alterar o pH do meio;
- ✚ Solúveis no ponto isoelétrico;
- ✚ Interação mínima com as proteínas;
- ✚ Baixo peso molecular.

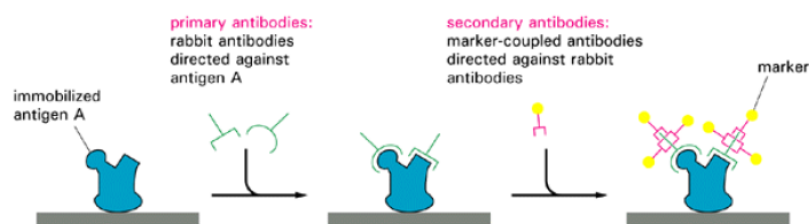
A proteína vai deslocar-se ao longo da matriz, sendo atraída pelo pólo de carga contrária à sua. Num determinado momento, a proteína atravessa a zona da matriz onde estão situados os anfólitos, cujo pH é igual ao seu ponto isoelétrico. Aqui, as cargas positivas da proteína vão ser iguais às cargas negativas, ficando a proteína neutra. Assim, ela vai deixar de ser atraída para um dos pólos e fica estática junto aos anfólitos com o mesmo ponto isoelétrico.

Nota: Como o ponto isoelétrico dos anfólitos é conhecido, então vai ficar a conhecer-se esse mesmo atributo nas proteínas.

4. Imunocitoquímica

A imunocitoquímica é uma técnica que permite localizar proteínas num determinado local do interior da célula. Para isso, utilizam-se moléculas específicas para as proteínas – os **anticorpos** – que localizam antígenos nas células. Por esta razão, este método é a base para a maioria dos processos que utilizam anticorpos no seu procedimento.

A visualização é conseguida através de um processo de marcação do anticorpo feita com enzimas ou fluorocromos (substâncias fluorescentes). Como não é possível marcar todos os anticorpos (porque existe um número muito elevado de proteínas), inicialmente vão ser utilizados os anticorpos que não estão marcados.



Os antígenos primários são produzidos directamente pelo organismo receptor do anticorpo e os antígenos secundários são originários de um outro organismo. No entanto, estes são marcados, inseridos no interior do primeiro organismo e vão permitir o reconhecimento da região constante dos anticorpos.

5. Citometria de fluxo

Este método de estudo permite identificar células através de dois mecanismos: ou pela luz que as células difundem, ou pela fluorescência emitida quando atravessam um feixe de raios laser.

Aqui, a separação das células pode ser efectuada tendo em conta três factores:

- ✚ Marcadores;
- ✚ Tamanho das células;
- ✚ Conteúdo de DNA.

6. Microscopia

Uma vez que as células têm dimensões muito pequenas, ou seja, têm uma dimensão inferior ao poder de resolução da visão humana, torna-se obrigatória a utilização de aparelhagem adequada para a sua observação: os microscópios.

Consoante os microscópios, pode estudar-se:

- ✚ Processos *in vitro* – células em cultura, ou seja, a morfologia de células isoladas ou de tecidos (identificar os determinados tipos de células que fazem parte do tecido);
- ✚ A localização de determinadas substâncias desejadas;
- ✚ Processos *in vivo* – seleccionar células vivas e injectar-lhes determinadas substâncias no seu interior observando, por exemplo, um determinado momento do ciclo celular.

No caso do estudo de células em tecidos ou do estudo da sua morfologia, recorre-se usualmente a microscópios ópticos.

Por outro lado, no caso de se estudarem as células isoladas ou mesmo um determinado organismo, procedem-se a ensaios *in vitro* e *in vivo*.

6.1. Microscópio de fluorescência

Estes microscópios são usados para estudar processos biológicos na célula e a localização de determinadas substâncias no seu interior, utilizando-se para o efeito corantes especiais, designados **fluorocromos**. Estes têm a capacidade de localizar os constituintes desejados no interior das células, existindo vários tipos:

- ✚ Vermelhos – rodamina
- ✚ Verdes – fluoresceína

Consoante o fluorocromo utilizado, vai ser emitida uma luz de determinada cor (vermelho ou verde), tendo em conta aquilo que for reconhecido. Assim, quando se liga o microscópio, é possível observar um campo escuro com várias zonas coloradas dessas duas cores.

A sua utilização baseia-se na propriedade que certas substâncias têm de absorver a luz a um determinado comprimento de onda e, posteriormente, emitir luz a um comprimento de onda superior. Este mecanismo depende do fluorocromo que está a ser utilizado, dentro do espectro visível, no entanto existe apenas um número reduzido de substâncias com capacidades de fluorescência: a clorofila, a riboflavina, a vitamina A ou a porfirina.

A base da técnica para observar as células neste tipo de microscópio é exactamente a mesma que é usada no microscópio de campo claro. Porém, enquanto no primeiro os anticorpos têm que estar marcados com fluorocromo para serem vistos no microscópio, no segundo, os anticorpos têm de estar marcados com uma dada enzima para ficarem corados.

É por isso que a técnica de fluorescência vai decaindo, ou seja, ao fim de algum tempo de permanência do fluorocromo nas células, o seu efeito desaparece.

Desvantagens:

- ✚ Durante a focagem, focam-se vários planos simultaneamente, ou seja, verifica-se uma sobreposição de imagens fluorescentes das moléculas, a profundidades da célula, o que exhibe uma imagem com pouca definição.
- ✚ Durante a fixação, pode haver destruição da antígenicidade das proteínas, o que vai dificultar a sua ligação aos anticorpos, portanto a fluorescência emitida perde eficácia.
- ✚ É difícil utilizá-lo para secções de células finas.
- ✚ O próprio meio em que as células estão pode emitir fluorescência, obscurecendo o sinal emitido pelo anticorpo (fenómeno “*declant*”).

6.2. Microscópio confocal

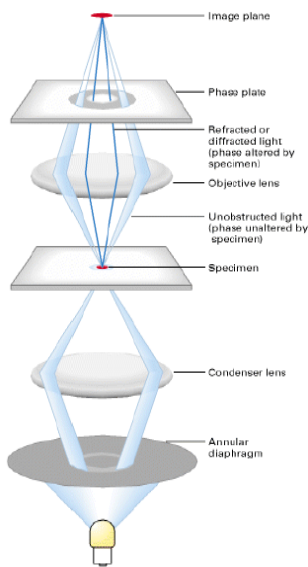
Tal como o microscópio anteriormente referido, este também emite fluorescência durante o processo de observação. No entanto, difere do microscópio de fluorescência nos seguintes aspectos:

- ✚ Permite visualizar as moléculas num único plano de focagem e forma uma imagem a nível de computador (imagem tridimensional com mais pormenores) e bastante mais definida – **deconvolução**.
- ✚ Utiliza raios laser.
- ✚ Tanto a fluorescência do *declant* como a sobreposição de planos desaparecem.
- ✚ Devido ao seu elevado custo, são usados nos laboratórios, os de fluorescência e não confocal.

6.3. Microscópio de contraste de fase / de interferência

Este microscópio é bastante utilizado para células vivas, em culturas, ou para observar movimentos celulares. Baseia-se nas diferenças entre os índices de refração, entre o interior da célula e o exterior da célula e zonas das células. Assim sendo, as diferentes espessuras e os diferentes tipos de refração irão converter-se em zonas claras e escuras.

O que este microscópio tem de especial relativamente aos outros, no que diz respeito à morfologia é uma placa com um anel com orifício e um anel escuro. Isto faz com que os raios que atravessam a



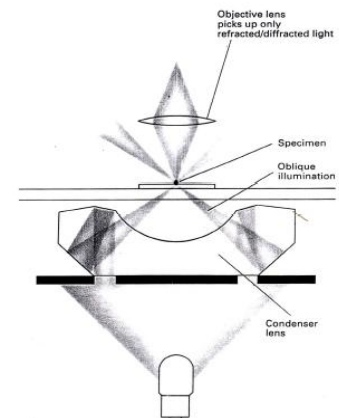
preparação sofra refacção e difracção, atingindo a objectiva ao atravessar o objecto. Os raios de luz não sofrem quaisquer desvios e passam pelo anel escuro ao induzir um atraso à fase da onda, permitindo assim observar as zonas claras e escuras com maior nitidez.

A principal desvantagem deste microscópio é o facto de apenas ser possível observar células isoladas ou tecidos ou cortes extremamente finos.

6.4. Microscópio de fundo escuro

É muito utilizado na microbiologia e serve para observar estruturas muito pequenas, como as bactérias. Com este microscópio observamos o fundo escuro e estruturas extremamente brilhantes.

Quando se liga o microscópio óptimo, é possível o fundo todo iluminado, o que não acontece com o microscópio de fundo escuro, na medida em que os raios partem da fonte luminosa, atravessam o condensador, mas nem todos atingem a objectiva. Apenas aqueles que atravessam também o objecto é que irão atingir a objectiva, dando origem às estruturas brilhantes que constituem as células que se pretendem observar.



6.5. Microscópios electrónicos

Estes microscópios servem, principalmente, para estudar todas as estruturas existentes no interior da célula. Em comparação com os restantes, estes utilizam um feixe de electrões (em vez de fotões), existindo uma grande diferença de potencial entre o cátodo (filamento de tungsténio) e o ânodo que vai permitir a obtenção de uma boa definição da imagem observada.

Quanto maior a voltagem, maior a definição da imagem e maior a resolução do microscópio.

O poder da resolução aproxima-se dos 0.1 nm, sendo muito pequeno em valor, mais muito grande na visualização das células. Esta diferença de potencial provoca uma aceleração dos electrões, sendo que para evitar as interferências deste excesso de aceleração, todo o sistema está inserido num tubo constituído apenas pelo vazio, a fim de não haver absorção de electrões.

Possui lentes electromagnéticas onde se colocam as amostras, no entanto a imagem é visualizada num ecrã.

Modo de funcionamento:

1. Quando o filamento de tungsténio é aquecido no vácuo, produz electrões.
2. Há uma grande diferença de potencial entre o ânodo e o cátodo, que leva à aceleração dos electrões.
3. Os electrões passam no condensador e atingem o objecto a observar – os electrões têm fraco poder de penetração logo os cortes devem ser extremamente finos.
4. Muitos electrões são dispersos pelos constituintes da estrutura celular e contribuem para a formação de uma imagem intermédia dada pela objectiva. Após a passagem dos electrões, as estruturas celulares ficam destruídas.
5. Esta imagem é depois ampliada por outra bobina projectora que equivale à ocular do microscópio óptico.
6. A focagem é feita pela variação da corrente electrónica que passa através das lentes electromagnéticas.

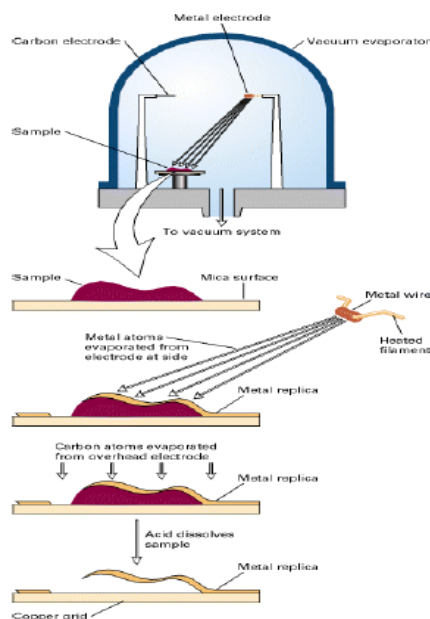
Tipos de microscópios electrónicos:

- ✚ Transmissão (difere do segundo devido à diferença de potencial)
- ✚ Transmissão de alta voltagem
- ✚ Esquadrinhamento – SEM
- ✚ Integrado – STEM (transmissão + enquadrinhamento)

6.6. Microscópio de esquadrinhamento

Observa-se a superfície da amostra não seccionada.

A superfície da célula é fixada, seca e recoberta por um metal pesado (platina), visualizando-se então uma película sobre a amostra. Os electrões chocam com a camada metálica e são emitidos formando uma imagem tridimensional.



7. Métodos de introdução de substâncias na célula

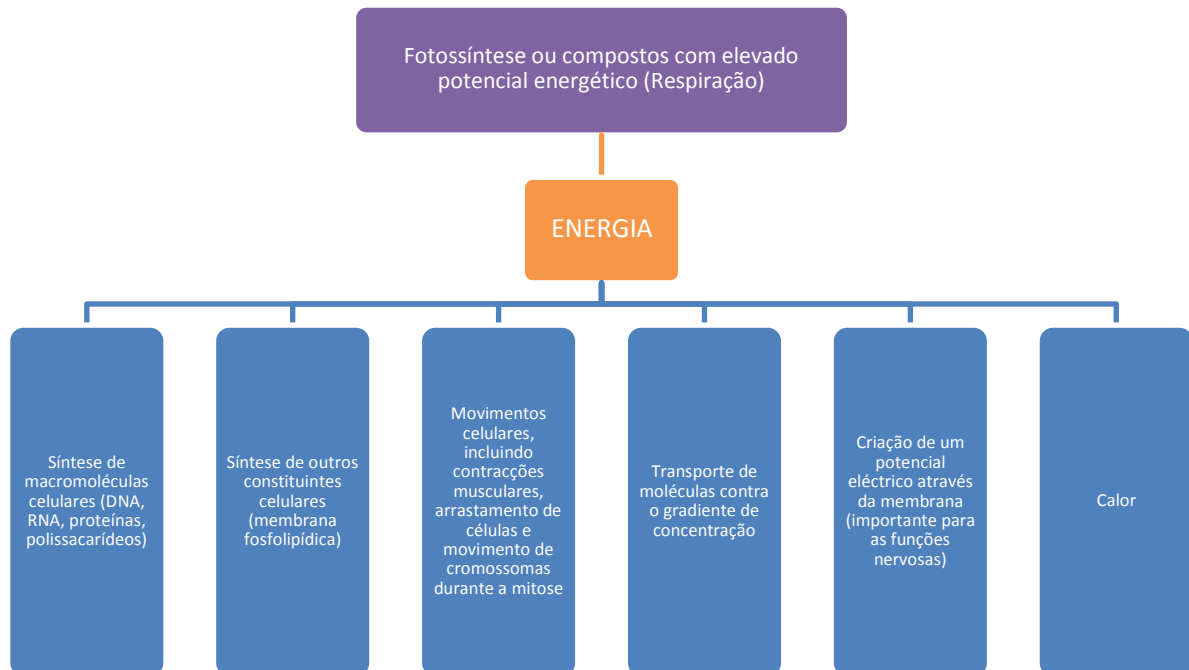
Microinjecção – utilização de uma seringa sendo que se injectam as substâncias quando estão prestes a ser analisadas no microscópio. De seguida, o sistema a ser utilizado vai induzir alterações ao nível da membrana celular.

Electroporação – colocação das substâncias desejadas de inserir na célula em choques eléctricos que alteram a abertura de poros existentes na célula. Se estiverem fechados, impedem que as substâncias que entraram voltem a sair, e é possível que se registem os efeitos dessas substâncias na conformação celular.

Lipossomas – ao contactar com a membrana celular, as vesículas têm de ter proteínas reconhecidas como sendo proteínas membranares através de receptores. Depois disto, fundem as 2 membranas, dando-se a libertação do conteúdo da células vesiculares.

Introdução de genes – introdução de partículas de DNA na célula sem alterar a conformação da sua membrana plasmática.

Capítulo 4 – Energia celular



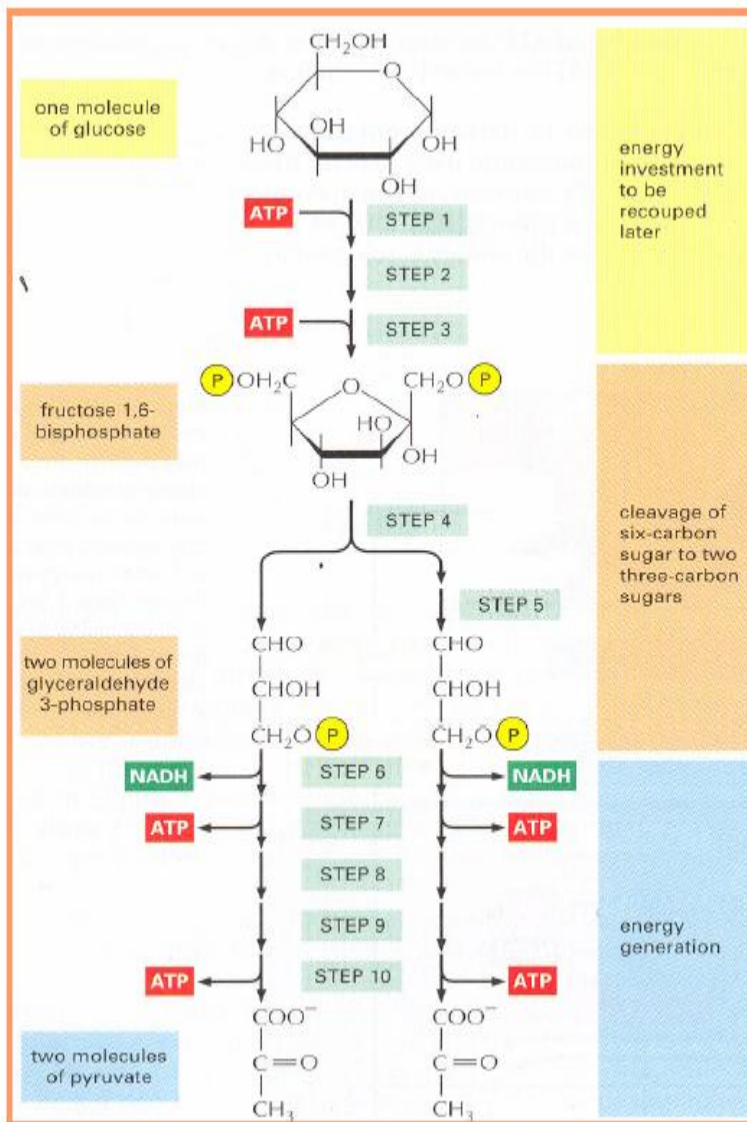
1. Glicólise

A glicólise é a sequência metabólica de várias reacções enzimáticas, em que a glicose é oxidada produzindo duas moléculas de ácido pirúvico e dois equivalentes reduzidos de NAD^+ , que ao introduzirem-se na cadeia respiratória, produzem duas moléculas de ATP.

Os organismos primitivos originaram-se num mundo cuja atmosfera carecia de O_2 e, por isso, a glicólise é considerada com sendo a via metabólica mais primitiva, estando portanto presente em todas as formas de vida actuais.

Este processo, nos seres eucariontes, ocorre no citosol.

A glicólise divide-se em duas partes principais:



Na **primeira**, a glicose é fosforilada com o gasto energético de uma molécula de ATP para originar a glicose-6-fosfato, que se isomeriza para formar frutose-6-fosfato. A partir desta molécula e com gasto de outra molécula de ATP, forma-se a frutose-1,6-bisphosphate. Assim sendo, nesta fase, foram gastas duas moléculas de ATP. Esta é uma reacção irreversível na qual intervém a glicose e o ATP, onde constam cinco reacções bioquímicas. A importância dos intermediários fosforilados é:

Grupos fosfato são ionizados a pH 7, dando uma carga negativa aos intermediários que então, não conseguem atravessar a membrana celular;

Grupos fosfato são essenciais na conservação da energia metabólica;

A ligação dos grupos fosfato ao centro activo da enzima fornece a energia de ligação.

Na segunda parte, a frutose-1,6-bisphosphate divide-se em duas moléculas: gliceraldeído-3-fosfato e

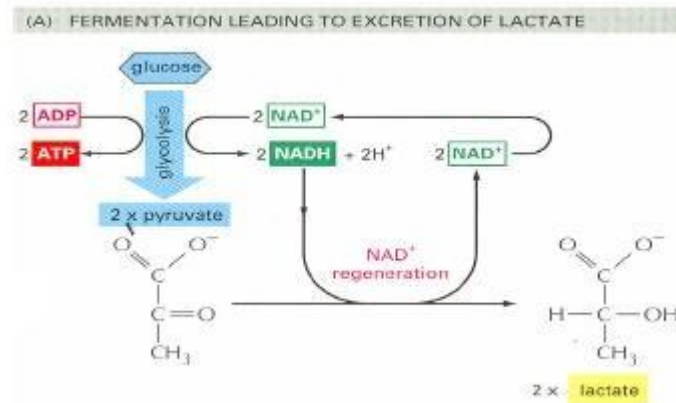
dihidroxiacetona-fosfato, por meio da enzima aldolase. Esta última molécula vai transformar-se também em gliceraldeído-3-fosfato, duplicando a reacção a partir deste momento. O gliceraldeído-3-fosfato sofre cinco reacções bioquímicas até se converter em piruvato. O piruvato pode ser oxidado a acetil-CoA na presença de oxigénio (na matriz mitocondrial) e o NADH formado vai ser oxidado através da oxidação mitocondrial.

2. Fermentação

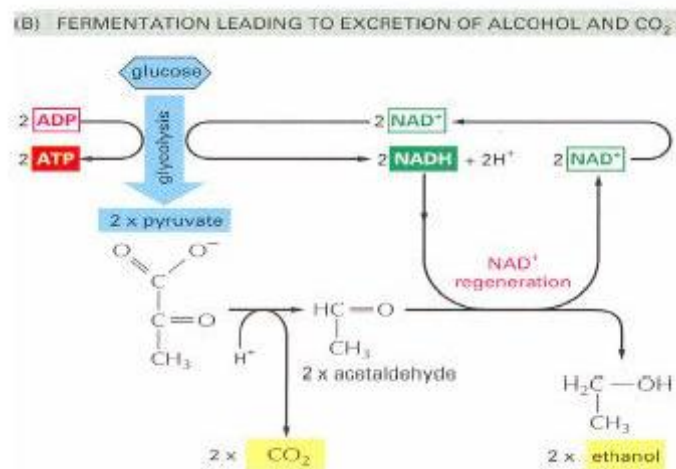
A fermentação é um processo anaeróbico de transformação de uma substância noutra, produzida a partir de microrganismos, tais como bactérias e fungos, chamados nesses casos de fermentos.

Existem vários tipos de fermentação, entre os quais:

✚ **Fermentação láctica** – em que o piruvato origina o ácido láctico.



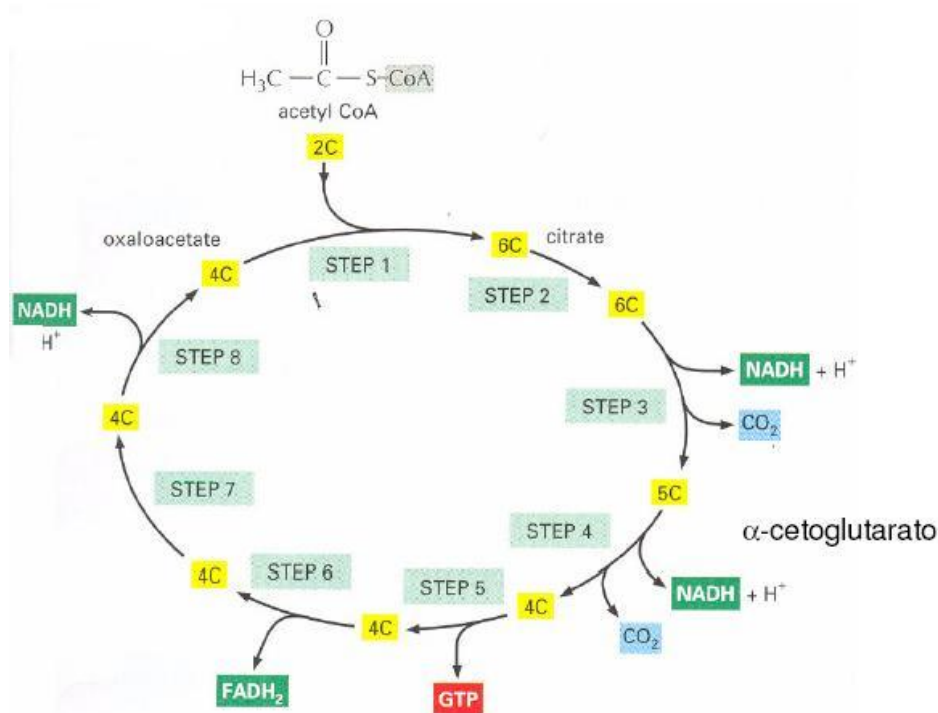
✚ **Fermentação alcoólica** – em que o piruvato origina etanol e CO₂.



3. Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs corresponde a uma série de reacções químicas que ocorrem no metabolismo celular. É efectuado nas mitocôndrias dos eucariontes e no citoplasma dos procariontes. Trata-se de uma parte do metabolismo dos organismos aeróbios (utilizando oxigénio da respiração celular) mas também dos organismos anaeróbicos (através da glicólise, por exemplo).

Este ciclo inicia-se quando o piruvato que é sintetizado na glicólise é transformado em acetil-CoA por acção da enzima piruvato-desidrogenase. Este composto reage com o oxaloacetato que é um produto do ciclo anterior, formando-se citrato. Este vai dar origem a um composto de cinco carbonos, o α -cetoglutarato com libertação de NADH e de CO_2 . Por sua vez, o α -cetoglutarato vai dar origem a outros compostos de quatro carbonos com formação de GTP, FADH_2 , NADH e oxaloacetato.

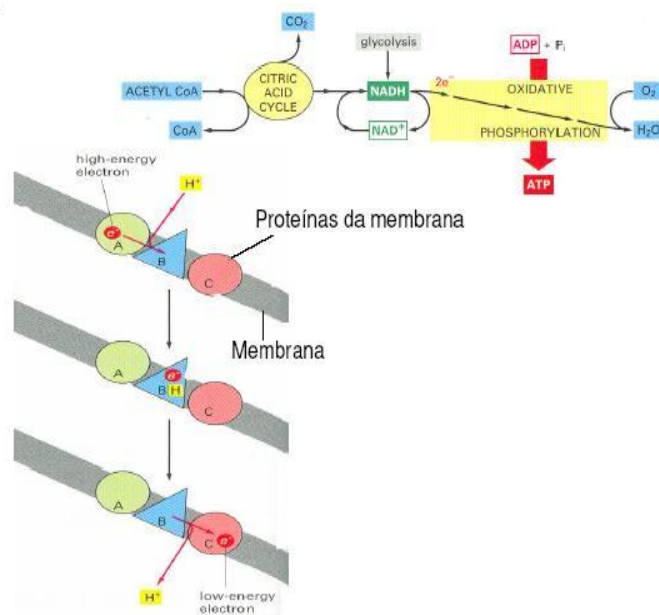


4. Fosforilação oxidativa

O processo de fosforilação oxidativa refere-se à fosforilação do ADP em ATP, utilizando para isso a energia libertada nas reacções de oxidação-redução.

As transferências de electrões constituem reacções desse tipo, que se processam com libertação de energia, que pode ser aproveitada biologicamente para a síntese de ATP. A energia do transporte de electrões é primariamente utilizada para bombear protões para o exterior da matriz mitocondrial. Como consequência deste mecanismo, vai haver a formação de um gradiente de protões, ou seja, um conjunto de concentrações de protões diferentes dentro e fora da mitocôndria. Como a membrana interna deste organelo é impermeável a protões, eles só podem voltar à matriz e desfazer o gradiente através de locais específicos da membrana interna.

A carga fica mais positiva no espaço intermembranar, devido à maior concentração de protões e o pH fica sucessivamente mais ácido, o que conduz à produção de ATP através da ATP sintase.



5. Síntese de polímeros

Existem monómeros que contêm a energia necessária à sua própria ligação à cadeia em crescimento (Tail polymerization) – ex.: ácidos nucleicos e polissacarídeos.

Existem monómeros que transportam a energia necessária para que se ligue o monómero seguinte (Head polymerization) – ex.: proteínas e ácidos gordos.

6. Ciclo do azoto

O ciclo do azoto pode ocorrer nos nucleótidos ou nas proteínas. No caso dos nucleótidos, é originado nas dietas e na biossíntese, pois o azoto das bases azotadas é proveniente da glutamina, da glicina (aminoácidos também importantes para a síntese de outros compostos) e do ácido aspártico. Por sua vez, as pentoses ribose e desoxirribose são provenientes da glicose. No que diz respeito às proteínas, a origem é semelhante à dos nucleótidos.

Na biossíntese de polímeros, podem existir reacções favoráveis quando se produz energia necessária para a síntese de moléculas ou reacções desfavoráveis quando não ocorrem devido à ausência de energia.

Relativamente à regulação, é controlada por mecanismos de feedback negativo e de modificações enzimáticas. Isto acontece pois as enzimas só são activas quando estão fosforiladas.

Capítulo 5 – Mecanismos genéticos

1. Replicação semiconservativa do DNA

Na replicação da molécula de DNA, cada cadeia parental serve de modelo para a síntese de uma cadeia filha que lhe é complementar, processo que culmina com a obtenção de duas moléculas filhas idênticas ao *duplex* inicial. Neste mecanismo de replicação, intervém um conjunto de factores proteicos que constituem a maquinaria de replicação e que vão actuar ao longo de várias fases deste complexo processo.

⇒ Enzimas envolvidas no processo

DNA polimerase – enzima chave que catalisa a incorporação de desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato (dNTP) na cadeia nascente de DNA. Nos procariontes, existem 3 tipos: as polimerases I e III são essenciais ao processo de replicação, enquanto que a actividade da polimerase II está mais ligada ao processo de reparação. Nos eucariontes, existem 5 tipos, mas apenas 2 são mais relevantes para o processo da replicação do DNA. A polimerase α inicia a cadeia continua e sintetiza os fragmentos de Okazaki e a polimerase δ faz o alongamento da cadeia contínua.

Helicase – quebra as pontes de hidrogénio entre bases complementares das 2 cadeias.

Proteínas SSB (single stranded binding proteins) – ligam-se à cadeia de modo a que não se restabeleça a dupla hélice, enquanto as outras enzimas não estão ainda a actuar.

DNA primase – sintetiza uma pequena molécula de RNA (primer).

DNA ligase – liga os nucleótidos de modo a formar-se uma cadeia.

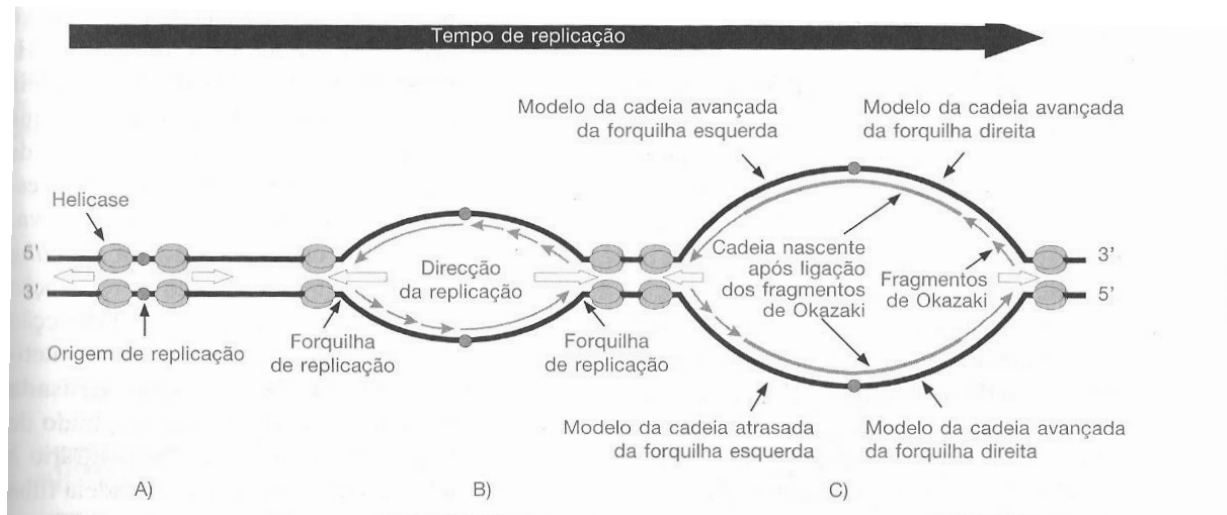
Topoisomerases I e II – evitam o super-enrolamento da cadeia, após a actuação da helicase, cortando-a em locais estratégicos. A topoisomerase II necessita de ATP para actuar.

⇒ Mecanismo geral de replicação

✚ De um modo geral, o processo de replicação inicia-se a partir de uma origem de replicação reconhecida por um complexo de reconhecimento da origem (ORC – Origin Recognition Complex), que após associação com outras proteínas, vai localizar nesse local dois complexos hexaméricos de tipo **helicase** que se vão mover em direcções opostas na cadeia parental a partir da origem.

✚ Estas enzimas desenrolam as duas cadeias que compõem a dupla hélice, quebrando as ligações de hidrogénio estabelecidas entre as bases azotadas complementares de cada cadeia.

✚ Às duas cadeias simples assim obtidas, associam-se proteínas multiméricas específicas que se vão manter numa estrutura adequada ao seu reconhecimento pelo complexo de DNA polimerase, permitindo que possam servir de modelo à síntese das duas cadeias filhas que lhes serão complementares.



✚ Este conjunto de proteínas e DNA, localizado na zona da origem de replicação, vai originar a constituição de uma dupla **forquilha de replicação**, que se estende em direcções opostas para os dois lados da origem no caso mais comum da replicação bidireccional.

✚ De modo a iniciar a síntese de cada cadeia filha, e devido à impossibilidade de esta ser efectuada pelas DNA polimerases, um novo complexo enzimático denominado **primase** irá sintetizar um fragmento de RNA, o **fragmento iniciador** ou **RNA iniciador**, a partir da extremidade 5' de cada uma das novas cadeias a sintetizar. Este fragmento iniciador tem como função permitir a ligação à cadeia nascente das enzimas que constituem o complexo da DNA polimerase, para que este continue a síntese da cadeia filha na direcção 5' para 3'.

✚ No entanto, devido ao antiparalelismo da cadeia de DNA parental, das duas cadeias filhas a sintetizar, só uma poderá ser feita de modo contínuo na direcção 5' para 3' a partir da região da cadeia principal imediatamente adjacente à origem de replicação – esta será a **cadeia avançada** (cadeia contínua ou *leading*).

✚ A outra cadeia filha não poderá ser sintetizada de forma contínua, pois estará condicionada pelo facto da DNA polimerase ter uma única direcção de síntese (de 5' para 3'). Assim, esta **cadeia atrasada** (cadeia descontínua ou *lagging*) irá ser sintetizada na direcção oposta ao avanço da forquilha de replicação, através da síntese e posterior ligação de múltiplos segmentos de DNA, todos iniciados por um pequeno fragmento de RNA iniciador colocado pela primase – os **fragmentos de Okazaki**.

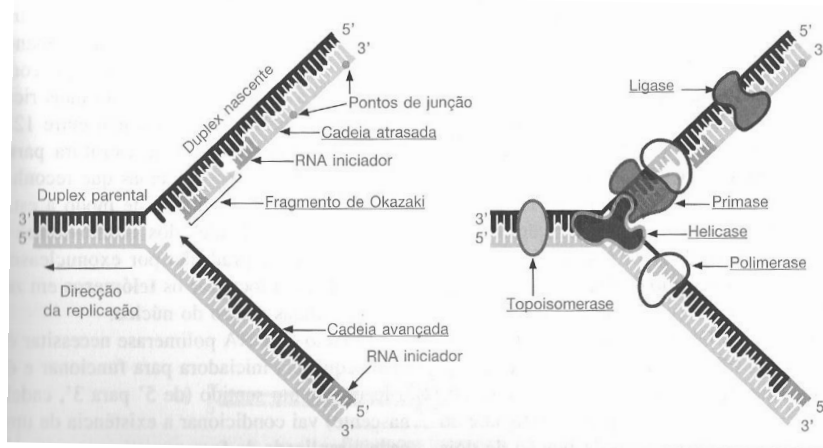
✚ O processo de junção de dois fragmentos de Okazaki implica a remoção do RNA iniciador existente no fragmento de Okazaki a partir da sua extremidade 5' por uma enzima do tipo RNase com actividade exonucleásica 5'-3'.

✚ Ao mesmo tempo, para preencher esse espaço, são adicionados novos nucleótidos na extremidade 3' do fragmento de DNA que lhe fica adjacente, com a ajuda de uma das DNA polimerases que constitui o complexo de replicação.

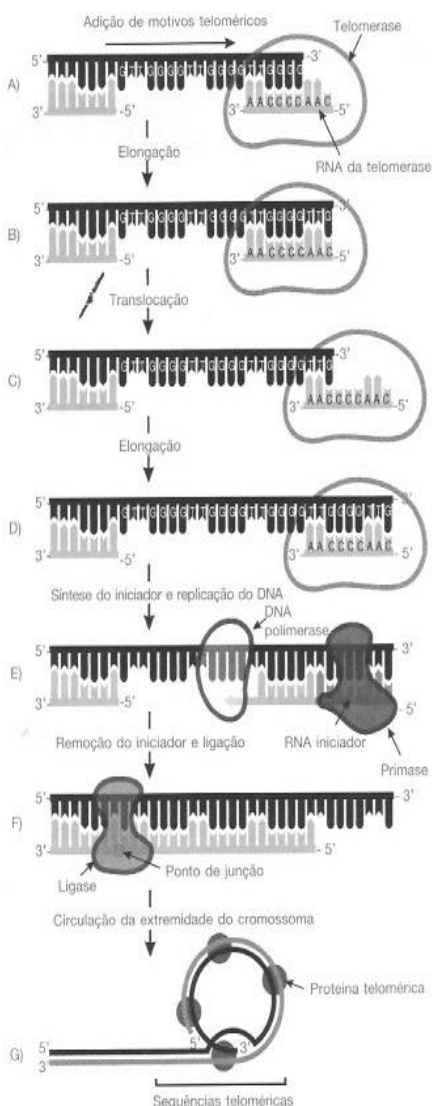
✚ Os dois fragmentos de DNA são finalmente ligados um ao outro pela **DNA ligase**, que estabelece a ligação fosfodiéster final entre o grupo 3'-OH do último nucleótido do primeiro fragmento de Okazaki e o alfa-P da extremidade 5' do fragmento de Okazaki adjacente que acabou de ser sintetizado.

✚ De modo a aliviar a tensão de torção das cadeias durante o seu desenrolar pela helicase, enzimas de tipo **topoisomerases** vão igualmente actuar neste processo. Estas enzimas associam-se com a dupla cadeia parental a montante de cada uma das helicases e removem a tensão provocada pela torção da

cadeia dupla através de uma série de cortes pontuais nas ligações fosfodiéster, reformadas de seguida pela mesma enzima, que vão ocorrer durante o desenrolamento efectuado pela helicase.



⇒ Replicação dos telómeros / Função da telomerase



A), B) A telomerase reconhece a cadeia simples deixada na extremidade 3' do telómer e após a replicação e adiciona a esta cadeia uma sequência telomérica por transcrição reversa, utilizando como modelo o RNA iniciador interno.

C) Por translocação, a telomerase reposiciona-se na nova extremidade 3' da cadeia e recomeça o processo.

D) Após mais uma etapa de transcrição reversa, foi colocado mais um motivo telomérico TTGGGG na extremidade 3'.

E) Utilizando a recém-sintetizada extremidade 3' como modelo, a primase vai sintetizar um RNA iniciador na direcção 5' para 3', ao qual se liga a DNA polimerase para iniciar a síntese de DNA e preencher o fragmento em falta.

F) A DNA ligase une o fragmento de DNA sintetizado *de novo* à extremidade 5' da cadeia preexistente. Após a remoção do RNA iniciador, a extremidade da cadeia 3' do cromossoma é complexada com proteínas teloméricas que vão promover a circularização da extremidade do cromossoma, de modo a estabilizá-la **(G)**.

⇒ Mecanismos de reparação de erros do DNA

✚ **Depurinação** – caso em que falta uma base na cadeia, criando-se portanto um local apurínico (caso a base em falta seja uma purina), ou um local apirimidínico (caso a base em falta seja uma pirimidina). Tem de haver quebra das ligações fosfodiéster entre nucleótidos, preenchimento do espaço vazio e novamente ligação dos nucleótidos. Para este processo, são então necessárias as seguintes enzimas:

- Endonucleases
- DNA polimerase
- DNA ligase

✚ **Desaminação** – caso em que um uracilo está no lugar de uma citosina; hipoxantina em vez de adenina ou xantina em vez de guanina. Neste processo intervêm as seguintes enzimas:

- DNA glicosidases (remove o uracilo)
- Endonucleases
- DNA polimerase
- DNA ligase

2. Transcrição

A transcrição constitui o mecanismo universal da expressão dos genes, unidades de DNA que contêm a informação necessária à especificação da síntese de todas as formas funcionais de RNA de cada célula.

Trata-se de um processo sequencial que se processa em 3 etapas:

- ✚ **Iniciação** – consiste no reconhecimento do sítio do DNA genómico que irá ser copiado em RNA, e condensação dos primeiros nucleótidos constituintes das extremidades 5'P do RNA nascente.
- ✚ **Elongação** – consiste na polimerização orientada dos nucleótidos, reflectindo a sequência do DNA molde, e obedece à regra da complementaridade estrutural das respectivas bases.
- ✚ **Terminação** – resulta da interrupção selectiva do processo de transcrição da cadeia molde do DNA, delimitada pelo último nucleótido de cada gene activo, que corresponde portanto à extremidade 3'-OH da cadeia de RNA transcrito.

Existem zonas do DNA que são reconhecidas pela RNA polimerase e por proteínas, como sendo o local de início da transcrição – **promotor**. Este é uma sequência de nucleótidos à qual se ligam proteínas que informam a RNA polimerase que pode iniciar a síntese da molécula de RNA. Contém zonas consenso como a TATA box que é altamente conservada e que existe na maior parte dos genes, constituída por nucleótidos de adenina e timina (TATAAT).

Existe uma proteína que reconhece o promotor – a TBP. Esta vai ligar-se à TATA box que se encontra 25 a 35 nucleótidos acima do início da cadeia e vão adicionar-se vários factores de transcrição.

A RNA polimerase II tem uma sequência de aminoácidos terminal carboxílico que se designa CTD – sinal reconhecido por outras enzimas e que indica que a molécula sintetiza o mRNA. Depois da RNA polimerase II

se ligar, é necessário que todos os factores de transcrição recebam a abertura da cadeia. Para isso é necessário o TFIIF, que actua como uma cinase, fosforilando as proteínas neste caso o terminal CTD.

⇒ Tipos de RNA

✚ **rRNA** – antes de passar para o citoplasma, associa-se a proteínas e forma as unidades do ribossoma.

✚ **mRNA** – RNA mensageiro, capaz de reconhecer o código proteico.

✚ **tRNA** – ler a informação contida no mRNA.

✚ **snRNA** – relacionado com o processo de *splicing*; reconhece zonas de RNA estranhas e remove-as.

✚ **snoRNA** – envolvido na degradação da molécula de rRNA sintetizado no nucléolo.

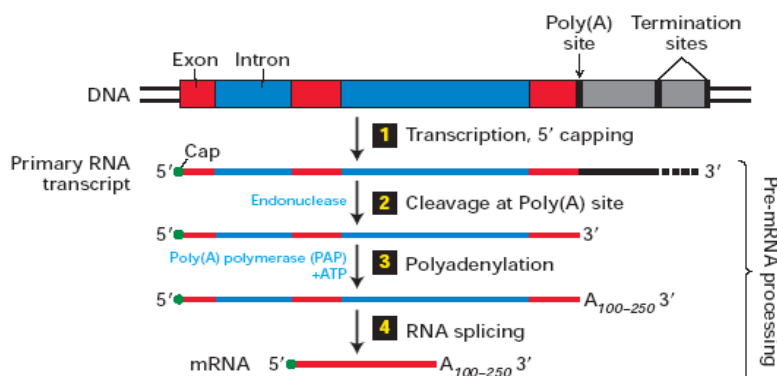
⇒ Tipos de RNA polimerases

✚ **RNA polimerase I** – responsável pela síntese de cerca de 80% da totalidade do RNA celular, localiza-se no nucléolo, transcrevendo os genes dos RNA ribossomais, que conduzem à produção dos rRNA 18S, 5.8S e 28S.

✚ **RNA polimerase II** – responsável pela síntese de 2% do RNA celular, localiza-se no nucleoplasma, e catalisa a síntese dos produtos primários precursores dos mRNA, que dão origem ao hnRNA nuclear.

✚ **RNA polimerase III** – responsável pela síntese de cerca de 20% do RNA celular, está igualmente localizada no nucleoplasma, e catalisa a síntese dos tRNA, snRNA e snoRNA.

3. Processamento do RNA heterogêneo (hnRNA)



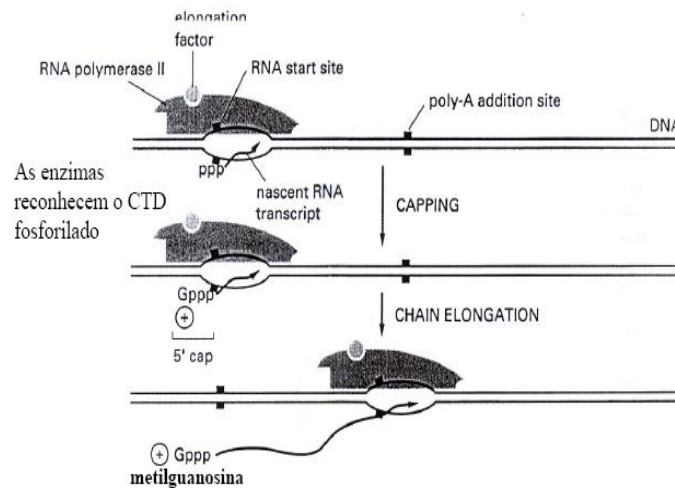
3.1. Capping

Nos eucariontes, a extremidade 5' da molécula é, imediatamente após a sua síntese, bloqueada pela fixação ao nucleótido 5' terminal da molécula, de um resíduo guanílico em posição invertida – a **metilguanossina**.

O capping ocorre ainda durante a fase de alongação das cadeias de RNA nascente. Esta estrutura, designada **cap**, é formada por adição do resíduo G proveniente do dador GTP, formando uma ligação de tipo pouco comum, 5'-5' trifosfato com o nucleósido trifosfato terminal da cadeia transcrita.

A presença desta estrutura 5' *cap* impede a degradação do mRNA e respectivos precursores intranucleares pelas fosfatases ou pelas exonucleases, ao mesmo tempo que estimula a tradução dos mRNA pelo aparelho de síntese proteica dos eucariotas, ao nível do citoplasma.

A estrutura *cap* não só protege os mRNA eucariotas da degradação pelas nucleases, como também intervém activamente na formação do complexo de iniciação da tradução.



Depois de as moléculas de RNA nascente produzidas pela RNA polimerase II atingirem um comprimento de 25 a 30 nucleótidos, a 7-metilguanossina e os outros componentes do 5' cap que se encontram no mRNA eucariótico, são adicionados à sua extremidade 5'. Este passo inicial do processamento de RNA é catalisado por um complexo enzimático associado ao CTD fosforilado.

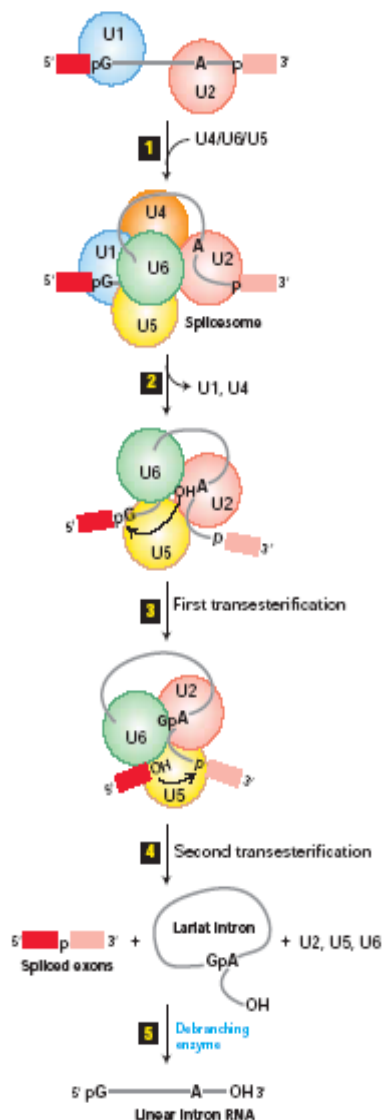
3.2. Splicing

Com apenas algumas excepções, a maior parte dos genes que codificam para as proteínas nos eucariotas superiores contém sequências não codificantes, os **intrões**, intercalados nas sequências codificantes, os **exões**.

O processo de eliminação dos intrões durante a maturação dos mRNA é designado **splicing**, e consiste na excisão-reparação das cadeias dos respectivos produtos primários da transcrição. O conjunto dos precursores do mRNA nucleares, que incluem as formas que se encontram nas diferentes fases de maturação, constituem o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA). Este não se encontra livre no nucleoplasma, mas sim associado a proteínas, sob forma de partículas ribonucleoproteicas que, no citoplasma, contêm os mRNA maduros, aptos a ser traduzidos pelos ribossomas.

Em unidades pequenas de transcrição, o fenómeno de *splicing* segue, normalmente, a poliadenilação da extremidade 3', enquanto que em maiores unidades de transcrição, contendo um grande número de exões, o *splicing* só se inicia quando a transcrição de todo o gene termina.

⇒ Splicing dos precursores dos mRNA



A eliminação das sequências intrónicas presentes nos produtos primários da transcrição dos genes mRNA dá-se mediante formação de estruturas em ansa no RNA transcrito, através de um mecanismo de transesterificação com formação de uma ligação 2'-5' fosfodiéster entre o resíduo adenílico do sítio de ligação do pré-mensageiro e o grupo fosfato do resíduo guanílico da extremidade 5' do intrão.

Existem, no núcleo das células, pequenos RNA, os **snRNA** (small nuclear RNA), que são constituídos por menos de 300 nucleótidos, em cuja composição predominam resíduos uridílicos. Estes encontram-se associados a proteínas, formando partículas chamadas **snRNP** (small nuclear ribonucleoproteins) às quais cabe um papel no processo de eliminação dos intrões da cadeia de RNA do produto primário da transcrição.

Nos eucariontes, a partícula U1-snRNP fixa-se ao sítio da clivagem, delimitado pela extremidade 5' do intrão, devido à complementar estrutural com uma sequência do U1RNA. O complexo U2-snRNP fixa-se ao sítio de ligação e ao nível da sequência de pirimidinas que se encontram a montante do sítio de clivagem, na extremidade 3' do intrão, enquanto a partícula U5-snRNP reconhece o próprio sítio de clivagem em 3'.

A ligação entre as proteínas U1 e U2 leva à aproximação das extremidades 5' e 3' do intrão, facilitando a segunda reacção de transesterificação necessária à ligação entre os dois exões. Actuam em seguida os complexos U4 e U6-snRNP associados numa partícula dotada da capacidade de formar um complexo com o precursor do mRNA, de grandes dimensões, o **spliceossoma**.

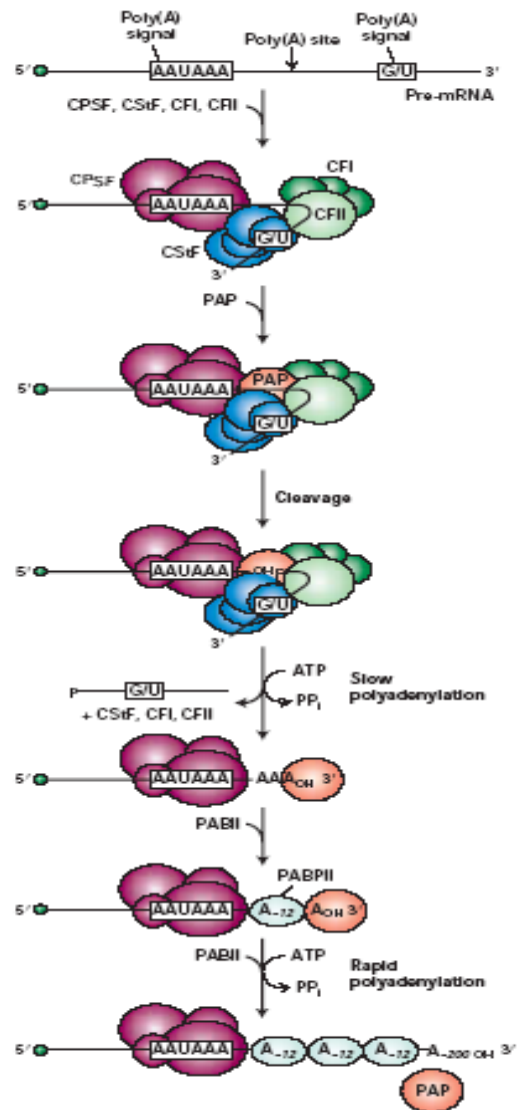
3.3. Poliadenilação

Na maior parte dos eucariotas, dá-se a adição de 200 a 300 resíduos adenílicos, que formam uma cadeia de poli A na extremidade 3' da molécula. Esta reacção é catalisada pela poli A polimerase que, juntamente com a endonuclease, constitui um complexo que inclui ainda uma partícula ribonucleoproteica contendo um pequeno RNA nuclear de composição rica em uridina, o U1RNA.

Uma poli-A polimerase (PAP) conecta-se a um complexo proteico antes de a clivagem ocorrer. Este facto para a conexão da PAP liga a clivagem e a poliadenilação, para que a extremidade 3' livre seja rapidamente poliadenilada.

Seguidamente à clivagem, a poliadenilação divide-se em duas fases: em primeiro lugar, dá-se a adição de 12 resíduos adenílicos de forma lenta e seguidamente ocorre a adição dos restantes 200-250. Esta última fase requer uma ligação de várias cópias de PABPII (polyA-binding protein).

Esta proteína tem a capacidade de ligar a cauda adenília mais curta inicialmente adicionada pela PAP, estimulando a polimerização de um novo conjunto de fragmentos adenílicos. Para além disso, a PABPII também é responsável por sinalizar à poli-A polimerase que pode finalizar a polimerização quando a cauda poli-A atinge um comprimento de cerca de 250 nucleótidos, ainda que o mecanismo para controlar esse tamanho ainda não seja conhecido.



4. Síntese do rRNA

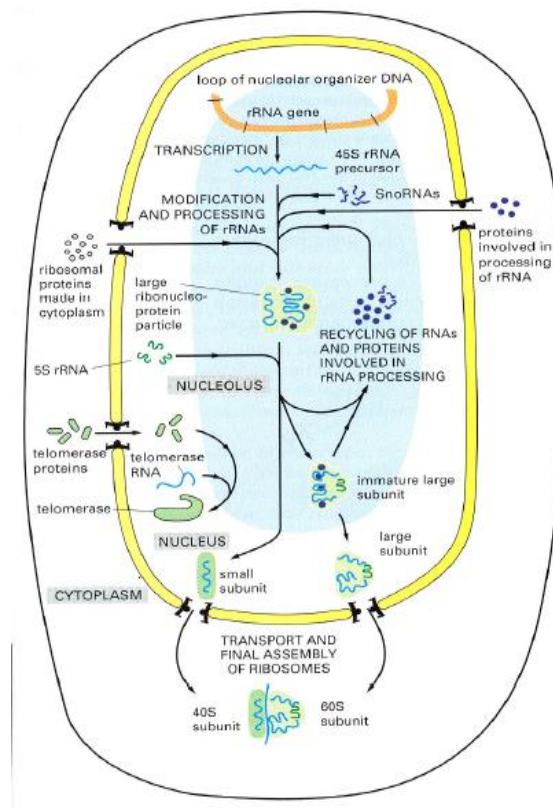
As moléculas de rRNA vão ser sintetizadas no nucléolo com excepção do gene que dá origem à fracção 5S, que existe no nucleoplasma. Existem várias fracções de rRNA que não se associam às proteínas, e que vão dar origem às duas subunidades dos ribossomas.

A fracção 45S é sintetizada pela enzima RNA polimerase I e a fracção 5S pela RNA polimerase III. A fracção 45S vai ser degradada por outras porções de RNA não codificadas designadas snoRNA (small nucleolar RNA), originando outras tres fracções de rRNA (5.85S, 18S, 28S).

A fracção 18S associa-se a proteínas, e dá origem à subunidade menor do ribossoma, enquanto que as fracções 5.85S e 28S dão origem à subunidade maior do ribossoma.

O componente fibrilar são as zonas do nucléolo que contêm os RNA's transcritos e a componente granular é composta pelas zonas que contêm os RNAs associados a proteínas. A lâmina nuclear é constituída por filamentos intermediários que fazem parte do citosqueleto e que são altamente

organizados, existindo cromatina associada à parte interna da membrana nuclear (heterocromatina – proteína em forma condensada, sem genes activos).



5. Tradução

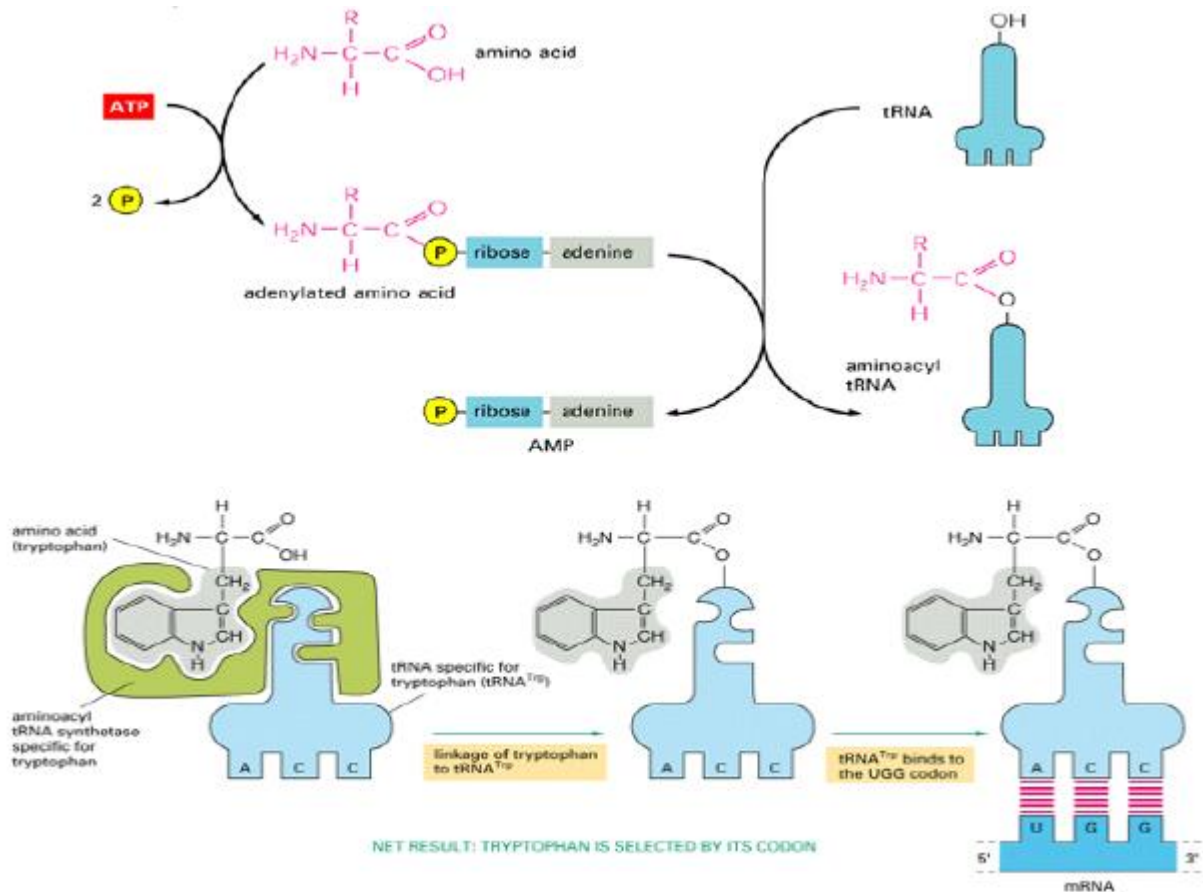
⇒ Formação do aminoacil tRNA

Esta fase é o primeiro passo da síntese proteica e só ocorre na presença da aminoacil tRNA sintetase, sendo que cada aminoácido tem a sua. Os aminoácidos de grandes dimensões penetram nas bolsas enquanto que os mais pequenos são inicialmente activados pelas AMP (adenina monofosfato).

A cada codão do mRNA corresponde um anticodão dum tRNA que transporta um aminoácido. As moléculas de tRNA podem servir de transportadores de aminoácidos, estabelecendo uma ligação covalente entre o grupo hidroxilo da ribose ligada à adenina no extremidade 3' e o grupo carboxilo do aminoácido a ser transportado.

A reacção catalisada pelas enzimas sintetase de aminoacil-tRNA utiliza ATP e permite a esterificação dos grupos OH em posição 3' ou 2'. A reacção ocorre em duas etapas: primeiro a formação dum aminoacil-adenilato com libertação de pirofosfato e depois a reacção com o tRNA para a formação do aminoacil-tRNA:

- ✚ O aminoácido é activado devido à ligação do AMP ao seu grupo carboxílico formando-se um aminoácido adenilado. Este AMP é proveniente da hidrólise do ATP já referido.
- ✚ O aminoácido adenilado é transferido para uma molécula de tRNA havendo uma ligação do grupo carboxílico do aminoácido e do grupo hidroxilo do açúcar 3' do tRNA, sendo que com esta ligação éster, fica formado o aminoacil tRNA.



⇒ 1 - Iniciação

A tradução inicia-se quando há um aminoacil tRNA que se liga ao local P da subunidade pequena do ribossoma, em vez de se ligar ao local A. Assim, com esta ligação, este aminoacil tRNA tem um códon complementar de iniciação AUG. A ligação do aminoacil tRNA ao local P, bem como a ligação da subunidade pequena ao mRNA, deve-se à participação de factores proteicos ou factores de iniciação (eIF, eIF1, eIF2 e eIF3).

O eIF2 vai, então, ligar-se à molécula de tRNA, fazendo com que esta molécula se possa ligar ao local P do ribossoma. No entanto, esta molécula pode sofrer alterações e deixa de se poder ligar ao tRNA, sendo necessários novos mecanismos de regulação.

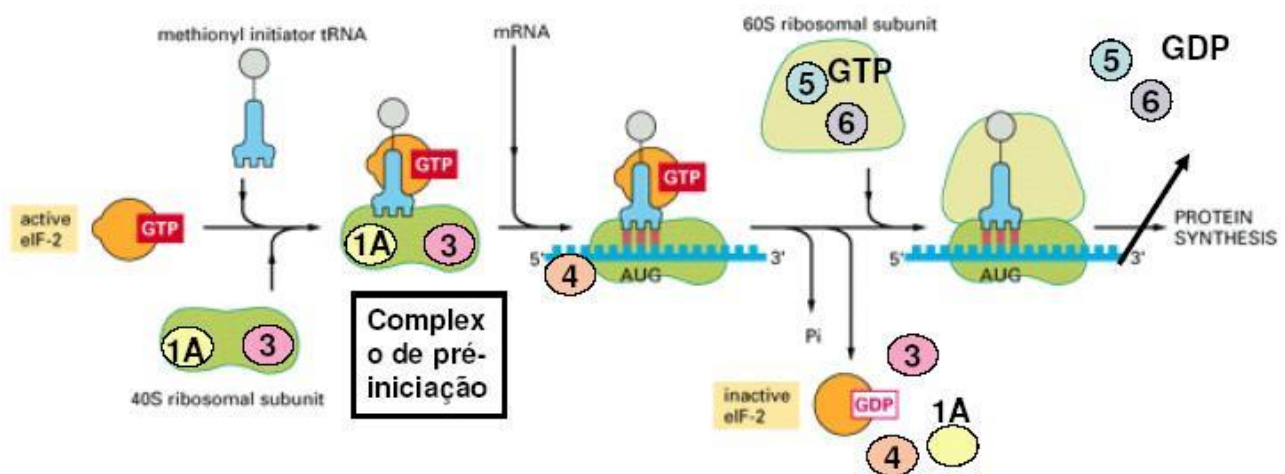
O eIF2 na forma inactiva tem ligado a si GDP e na forma activa, troca para GTP. Para isso, é necessário que o eIF2 sofra fosforilação através de cinases.

As duas subunidades do ribossoma estão separadas no citosol. A pequena está ligada ao eIF3 e a grande está ligada ao eIF6, sendo que quando se encontram nesta forma, perdem a capacidade de se unir e impedem o decorrer da tradução. Por sua vez, o eIF2 que permanece ligado ao GTP, pode associar-se ao aminoacil tRNA e para se conseguir ligar ao local P do ribossoma, tem de estar aqui associada a subunidade menor, ligando-se ao eIF1A, e formando um complexo de pré-iniciação (tem esta designação porque ainda não começou a síntese).

Depois de a molécula ter o eIF4, o complexo de iniciação liga-se, iniciando a síntese da molécula de RNA. No entanto, se o tRNA está ligado a outras moléculas, caso haja um novo aminoacil tRNA não vai ter capacidade de se ligar.

Quando se forma o complexo de iniciação, liga-se à molécula de RNA na extremidade 5' e segue até encontrar o codão AUG. Quando o encontra, dá-se o estabelecimento de pontes de hidrogénio entre o codão e o anticodão presente a nível do RNA. Quando há pontes de hidrogénio, a subunidade maior pode então ligar-se, mas inicialmente o GTP hidrolisa-se e o eIF2 deixa de ter capacidade de ligação e todos os factores ligados até ao momento, desligam-se também.

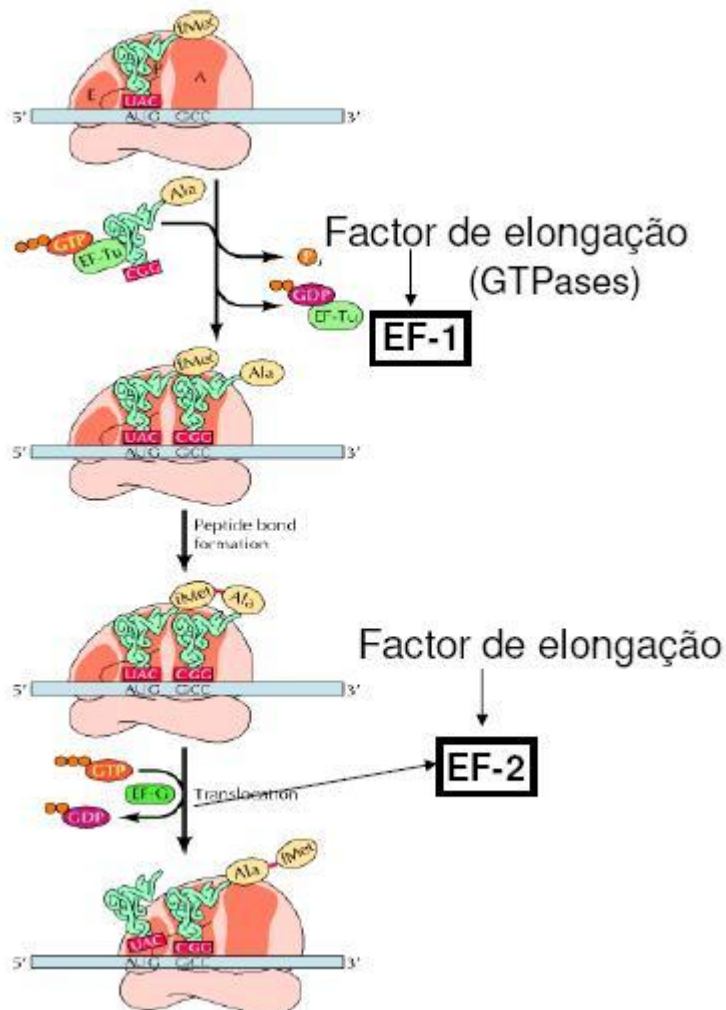
A partir deste momento, a subunidade maior do ribossoma já tem a capacidade de se associar à menor. No entanto, como tem ligado a si o eIF6, impede esta conexão, necessitando de um novo factor activo com uma molécula de GTP que permita a ligação do eIF6 à subunidade menor, o eIF5. Assim que a ligação ocorre, os factores eIF5 e eIF6 libertam-se, juntamente com a GTP, permitindo que finalmente se inicie a síntese do peptídeo.



⇒ 2 - Elongação

Factores de Elongação – permitem que a leitura codão-anticodão seja correcta.

Esta fase requer factores de elongação que se ligam a uma molécula de ATP e ao aminoacil tRNA, sendo que no caso dos eucariotas, este factor é o EF1, que para ser activo tem de ter uma molécula de GTP.



Em primeiro lugar, ocorre o emparelhamento entre o anticodão do tRNA e o respectivo codão do mRNA no local A, através de pontes de hidrogénio, bem como a hidrólise do GTP (em GDP + Pi). Esta hidrólise revela-se fundamental para que a leitura seja correcta existindo, enquanto isso, um tempo de espera.

Durante esse tempo de espera, verifica-se se o aminoacil tRNA é o correcto ou não:

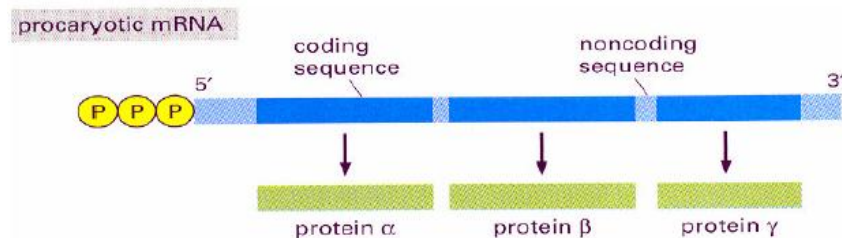
✚ Se for incorrecto, o número de ligações que se subtem entre o codão e o anticodão são menores e quando ocorre a hidrólise do GTP, liberta-se o factor EF1 e o aminoacil tRNA porque a ligação é fraca.

✚ Se for correcto, há separação do complexo (GDP + EF1) do local A, sendo libertados e o aminoacil tRNA mantém-se estável neste local.

A ligação peptídica existente entre o aminoácido do local A e do local P é sintetizada e catalizada pela enzima peptidiltransferase. Para que o local A fique livre, actua um segundo factor de elongação, o EF2. Este factor permite a translocação das moléculas de tRNA para outros locais do ribossoma e liga-se nas proximidades do local A, fazendo com que o ribossoma se desloque três nucleótidos.

Assim, ocorre a transferência do peptidil tRNA do local A para o local P, e de seguida para o local E, acompanhada da saída do tRNA que se encontrava no local P para o citosol. Quando ocorre este processo, o ribossoma altera a sua configuração e as suas ligações iniciais são modificadas.

Nos seres **procarióticos**, como não possuem o fragmento CAP, o que lhes indica onde se inicia a transcrição é uma sequência de nucleótidos junto à extremidade 5'. Na molécula de mRNA transcrita, acontece que a molécula tem várias sequências codificadas, podendo dar origem a várias proteínas, logo o mRNA procariótico é **policistrônico**.



7. Síntese e monitorização das proteínas

Transcrição – Processamento – Formação de mRNA – Passagem do mRNA para o citosol – Vários destinos

Depois de sintetizadas, as proteínas podem ter os seguintes destinos:

- ✚ Podem adquirir a sua conformação nativa;
- ✚ Podem necessitar de ajuda de outras moléculas para adquirirem a conformação adequada;
- ✚ Podem sofrer degradação;
- ✚ Podem ser agregadas.

8. Chaperões Moleculares

Enquanto a cadeia polipeptídica se encontra em crescimento, não pode enrolar para não adquirir configuração diferente do normal. Para que isto seja possível, ocorre a ligação de um conjunto de proteínas à cadeia em crescimento - os **chaperões moleculares** – impedindo:

- ✚ Que esta adquira uma má conformação;
- ✚ A precipitação das cadeias polipeptídicas (agregação de proteínas).

Existem dois tipos de chaperões moleculares, o HSP70 e o HSP60, e foram descobertos quando as células estavam sujeitas a aquecimento, verificando-se que havia proteínas em excesso.

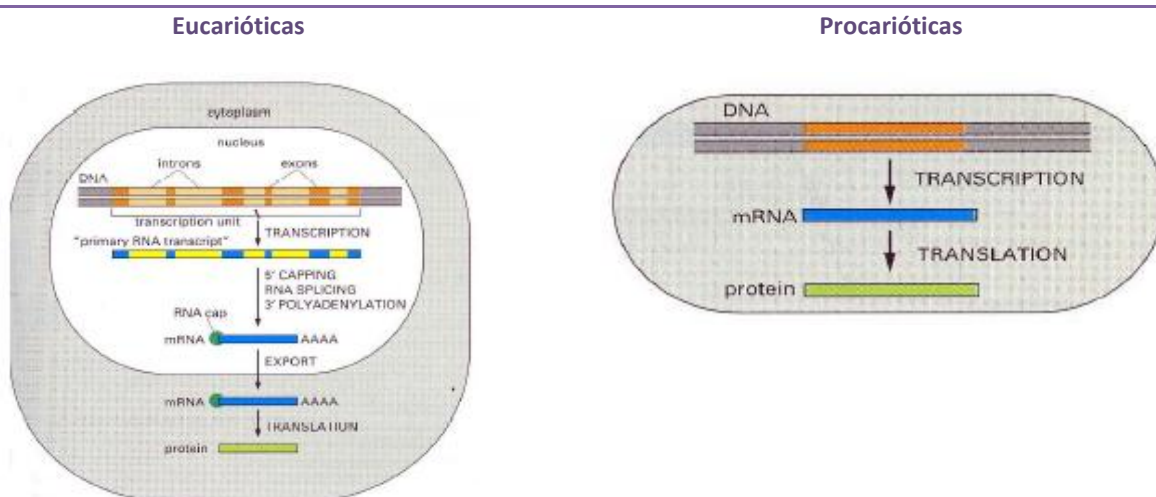
Quando a proteína está 100% sintetizada, os chaperões libertam-se e vai dar-se o estabelecimento de ligações favorecendo a conformação normal da proteína.

9. Ubiquitinação

A **ubiquitinação** é um processo de degradação de proteínas que permite remover os chaperões moleculares. Normalmente, as ubiquitinas existem em toda as células, havendo enzimas que permitem que elas se liguem à proteína que vai ser degradada, formando depois uma cadeia de ubiquitinas ligada à proteína.

As ubiquitinas ligam-se à proteína e sinalizam ao proteossoma (que reconhece a proteína com a cadeia de ubiquitinas) que existe uma molécula que tem de sofrer degradação. Esta molécula envia o sinal e é, mais tarde, reconhecida pelo nucleossoma.

10. Diferenças entre Eucarióticos e Procarióticos



Genes com zonas codificáveis e zonas não codificáveis.

Todos os genes são codificáveis (contêm exões).

Os genes são transcritos para uma molécula que vai sofrer processamento e de seguida passa para o citosol.

Os genes são transcritos no citoplasma (e não no núcleo) e a molécula não vai sofrer processamento.

O primeiro codão a ser transcrito é indicado pela metilguanósina que existe na extremidade 5', sendo o primeiro AUG que está mais próximo desta extremidade que vai indicar qual é o codão a ser traduzido.

O primeiro codão a ser transcrito é indicado por uma sequência de seis nucleótidos (logo indica que é nesse local que se vai iniciar também o processo de tradução).

O primeiro aminoácido é a metionina.

O primeiro aminoácido é: n-formil-metionin (derivado).

O processo de transcrição e de tradução dão-se em diferentes locais e a diferentes tempos.

O processo de transcrição dá-se no mesmo local que o processo de tradução.

O gene vai ser transcrito, processado e traduzido, dando origem a um único tipo de proteínas – RNA

Dá-se várias vezes o início do processo de tradução, dando origem a vários tipos de proteínas – RNA

monocentrónico.

poli-centrónico.

Capítulo 6 – Biomembranas

As membranas biológicas são, sob o ponto de vista estrutural, bicamadas de lípidos anfipáticos onde se intercalam, aqui e além, moléculas proteicas. São estruturas termodinamicamente estáveis, cuja manutenção não requer hidrólise de ATP.

As membranas biológicas permitem a separação do conteúdo celular do espaço extracelular, já que a natureza hidrofóbica do interior da camada lipídica impede a passagem de água. A troca metabólica de moléculas solúveis em água entre a célula e o espaço extracelular está condicionada pela formação de canais transmembranares resultantes da associação dinâmica de proteínas que se encontram intercaladas na bicamada fosfolipídica.

Nas células procarióticas, as membranas biológicas participam apenas na definição do limite da célula. Nas células eucarióticas, as membranas exercem também função de invólucro, tanto do núcleo como de organelos intracelulares. Assim, nestas células, as membranas biológicas têm um papel fundamental, na organização da topografia do seu meio interno, separando-o em vários compartimentos, sendo dois principais: o nuclear e o citoplasmático. As membranas subdividem ainda o citoplasma em dois espaços: um que é contínuo, designado por matriz citoplasmática ou citosol, que fica entre a membrana plasmática e as membranas do núcleo e dos organelos citoplasmáticos, e outro espaço, que é descontínuo, de topografia exoplasmática, constituído pelo somatório dos espaços contidos nos organelos ou vesículas que são limitadas por membrana.

1. Estrutura geral das membranas biológicas

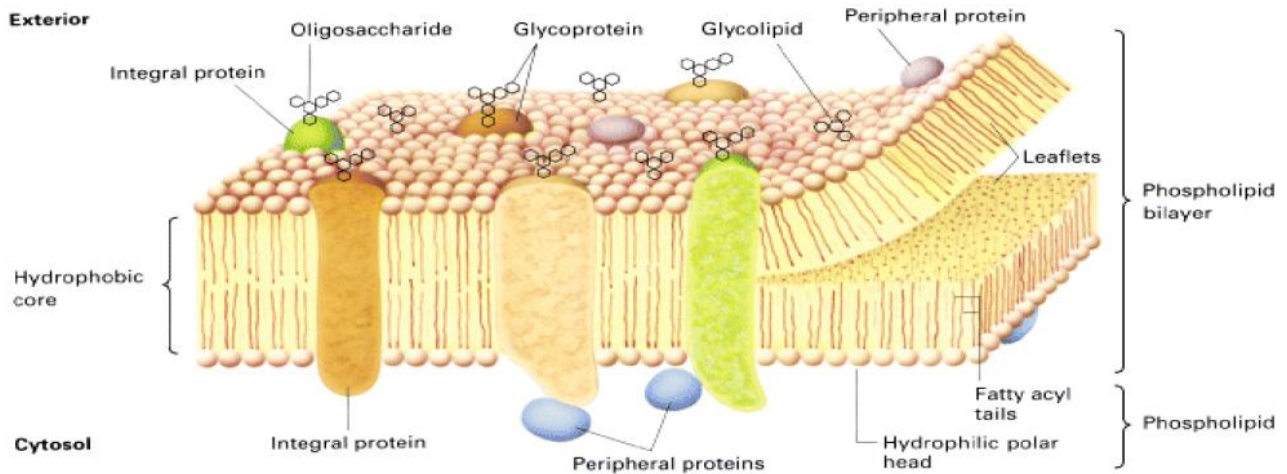
Apesar de serem componentes da célula que estão sujeitos a grande especialização, todas as membranas biológicas apresentam uma estrutura geral que lhes é comum. O elemento fundamental é a bicamada de fosfolípidos, todos de natureza anfipática, os quais fazem com que a membrana seja impermeável à água e a moléculas solúveis em meio aquoso.

A maioria das funções biológicas das membranas são mediadas pelas suas proteínas, as quais podem atravessar inteiramente a espessura da bicamada lipídica ou estarem associadas apenas a um dos seus folhetos. Por exemplo, na membrana exterior da célula, as proteínas servem de receptores moleculares, transmitindo informação do meio extracelular para o interior da célula, assim como formam junções intercelulares, catalisam reacções químicas ou ligam-se a componentes do citosqueleto.

As duas principais características das membranas biológicas são:

- ✚ **Fluidez** – traduz-se pelo marcado movimento lateral a que os fosfolípidos e as proteínas estão sujeitos ao longo do plano de cada um dos folhetos da bicamada.

- ✚ **Assimetria** – expressa-se pela diferente composição molecular observada nas duas metades da membrana: os fosfolípidos e as proteínas não se encontram distribuídos de forma equivalente nos dois folhetos da membrana, estando os glicolípidos presentes apenas no folheto exoplasmático da bicamada fosfolipídica.

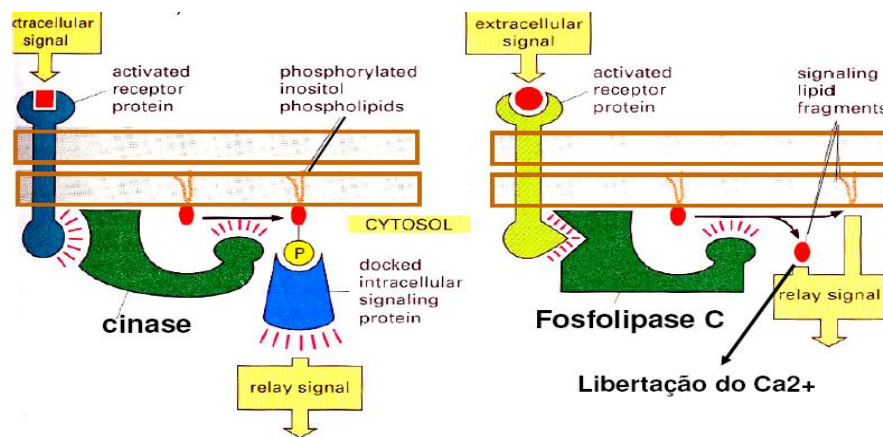


2. Os lípidos da membrana

- ✚ **Mobilidade** - O movimento lateral dos lípidos faz-se dentro de cada um dos folhetos da bicamada, sendo raras as permutas destas moléculas entre os dois folhetos (*flip-flop*) devido à barreira hidrofóbica que os separa, o que requer acção enzimática e consumo de energia.

A fluidez da bicamada depende da natureza química dos seus lípidos. Assim, um incremento de moléculas de colesterol diminui a fluidez da bicamada fosfolipídica, devido à interacção destas moléculas com as regiões polares dos fosfolípidos. De igual modo, a maior concentração de fosfolípidos saturados é encontrada no folheto externo da membrana torna este folheto menos fluido do que o folheto interno.

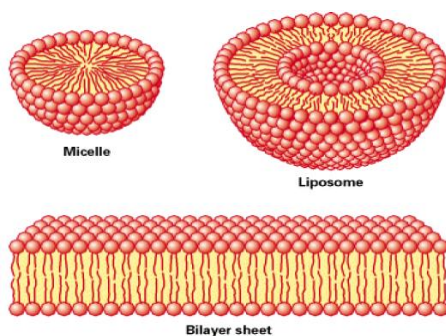
- ✚ **Assimetria** – A desigual composição química dos fosfolípidos nos dois folhetos da bicamada implica a natureza assimétrica da membrana. Os dois folhetos fosfolipídicos apresentam diferenças também de carga eléctrica, sendo o folheto citoplasmático o de maior carga negativa. As proteínas citosólicas ligam-se a determinados grupos polares das moléculas lipídicas, através de cinases, e os grupos polares das moléculas lipídicas sofrem modificação através da fosfolipase C (fosfatidilinositol). No entanto, a assimetria não é regra universal para todas as moléculas da membrana, já que as moléculas de colesterol se encontram na maioria das células dos mamíferos, em número semelhante nos dois folhetos da membrana.



2.1. Fosfolípidos

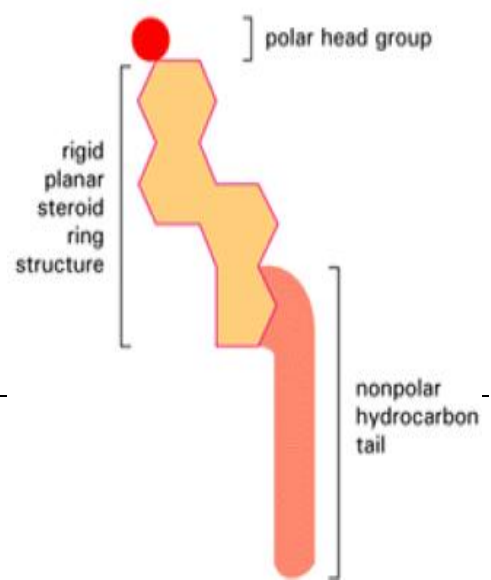
Os fosfolípidos são as moléculas lipídicas que se encontram em maior abundância nas membranas biológicas. Como moléculas anfipáticas que são, os fosfolípidos são constituídos por duas extremidades que reagem diferentemente à presença de água: uma hidrofóbica ou polar e outra hidrofílica ou apolar, sendo esta última constituída por duas caudas de ácidos gordos. Em presença de água, os fosfolípidos anfipáticos orientam-se de modo a evitarem o contacto das suas extremidades hidrofóbicas com moléculas de água. Por esta razão se organizam espontaneamente em pequenas formações esféricas – as **micelas** – ou, talcomo é observado, nas membranas biológicas, em bicamadas, com as extremidades hidrofóbicas dos fosfolípidos orientadas face a face, e para o interior da membrana. Cria-se assim um espaço interior à bicamada fosfolipídica, que é hidrofóbico e se furta ao contacto com a água.

Da composição fosfolipídica das membranas das células eucarióticas destacam-se, em termos quantitativos, quatro moléculas: fosfatidilcolina, esfingomiolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. O único destes fosfolípidos que apresenta carga negativa é a fosfatidilserina, os outros três fosfolípidos não apresentam carga a pH fisiológico. No entanto, os fosfolípidos que se encontram em pequena concentração na membrana plasmática podem ter uma grande relevância na fisiologia da célula. É o caso dos fosfolípidos de inositol, que são elementos cruciais em mecanismos de transmissão de sinal para o interior da célula.



2.2. Colesterol

Nas membranas da maioria das células eucarióticas, o colesterol é, a seguir aos fosfolípidos, a molécula lipídica que se apresenta em maior abundância. Em particular nas membranas de



células que estão sujeitas a alterações marcadas da sua forma, a presença de moléculas de colesterol é essencial para que não ocorram roturas na bicamada fosfolipídica.

As moléculas de colesterol têm também maior facilidade de saltarem entre os dois folhetos da membrana (movimento de *flip-flop*) do que os fosfolípidos. A sua presença reforça a impermeabilidade da bicamada à água, diminui a fluidez da membrana e também a temperatura a que se regista a transição de fase. As membranas de células procarióticas são totalmente desprovidas de moléculas de colesterol.

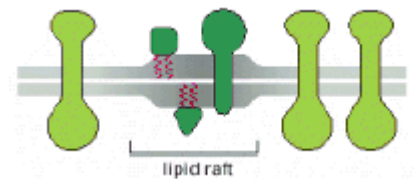
2.3. Glicolípidos

Os glicolípidos encontram-se apenas no folheto exoplasmático da membrana exterior das células eucarióticas. Ao contrário dos fosfolípidos e do colesterol, os glicolípidos não têm a mínima capacidade de fazer o movimento de *flip-flop* entre os dois folhetos da membrana.

Assim, estas moléculas podem actuar como receptores específicos de moléculas presentes fora da célula, podendo também ligar-se a componentes da matriz extracelular.

2.4. Rafts lipídicos

A membrana biológica não é toda ela de carácter homogéneo, existindo determinadas zonas onde se encontra uma maior concentração de algum tipo de moléculas, que exercem a sua função específica. Com isto, descobriu-se que existem microdomínios ao longo das membranas, onde ocorrem alguns procesos relacionados com a membrana.



Uma destas estruturas é constituída pelos “**rafts**” lipídicos que são zonas mais espessas, especializadas da membrana, ricas em esfingolípidos, colesterol e proteínas. Parecem estar envolvidos em mecanismos de adesão celular, sendo que as cadeias hidrocarbonadas dos esfingolípidos de uma monocamada interagem com os esfingolípidos da outra monocamada comunicando, assim, entre si.

3. As proteínas da membrana

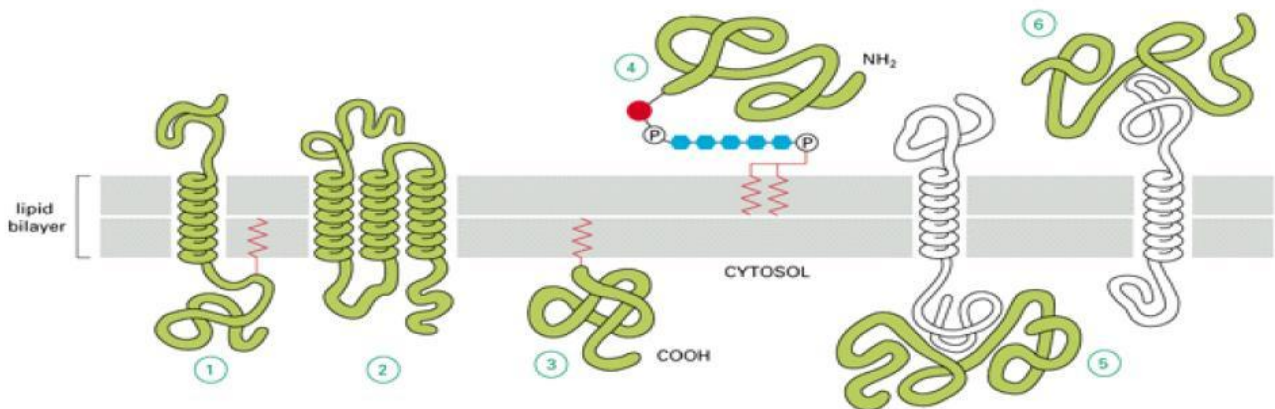
A massa de uma proteína da membrana de tamanho médio é 40 a 60 vezes superior à massa de um fosfolípido. Na maioria das membranas celulares, as proteínas contribuem para cerca de metade da sua massa total, o que permite concluir que as proteínas membranares estão como que “dissolvidas” num mar de pequenas moléculas lipídicas que, em número, lhes são dezenas de vezes superiores.

Boa parte das proteínas membranares, particularmente as que se expressam em espaços exoplasmáticos, contêm resíduos sacarídeos e são, portanto, glicoproteínas. O processo de glicosilação das proteínas (e dos glicolípidos) da membrana faz-se durante o seu tráfego intracelular e termina quando estas moléculas passam pelo complexo de Golgi. Tal como as moléculas lipídicas da membrana, as proteínas estão sujeitas a movimentos de rotação e de deslocamento lateral e, tal como acontece com os

glicolípido, não lhes é permitido movimento de *flip-flop* entre os dois folhetos da bicamada. Assim, os movimentos de lateralidade das proteínas na membrana podem ser medidos com exactidão, após conjugação de ligando fluorescente à proteína.

3.1. Proteínas integrais e periféricas

A identificação de partículas presentes nas preparações de membrana sujeitas a criofactura contribuíram para a criação do conceito de proteína integral e periférica.



✚ **Proteínas integrais (1, 2, 3, 4)** – atravessam o plano hidrofóbico da membrana e são observadas nas faces de fractura.

1 e 2 – Proteínas transmembranares

3 – Proteína ligada a um ácido gordo (sintetizada no citosol)

4 – Ligada ao glicosilfosfatidilinositol (sintetizada no retículo endoplasmático)

✚ **Proteínas periféricas (5, 6)** – não têm a capacidade de se integrar na membrana e são observadas nas superfícies de membranas intactas.

Por atravessarem a bicamada fosfolipídica, as proteínas integrais contêm, necessariamente, segmentos hidrofóbicos na sua molécula e, por isso, são de purificação mais difícil do que as proteínas periféricas.

O seu isolamento requer ruptura da bicamada fosfolipídica, o que pode ser obtido tratando preparações de membrana com detergentes (*Triton* ou *SDS*), os quais, devido à sua natureza anfipática, se ligam às regiões hidrofóbicas das proteínas integrais, separando as extremidades não polares dos fosfolípidos circundantes e formando micelas na água.

A purificação das proteínas periféricas é mais fácil: basta tratar as preparações da membrana com soluções de salinidade elevada, não sendo, portanto, requerida disrupção prévia da bicamada fosfolipídica.

NOTA: Ora dentro das proteínas transmembranares consoante a função dessas proteínas das membranas, elas podem obter ou apresentar estruturas de elementos diferentes. As proteínas transmembranares, portanto aquelas que atravessam totalmente a membrana podem ser proteínas transportadoras:

- ✚ Ou transportam moléculas de um lado para o outro da membrana, apresentando uma estrutura em α hélice que atravessa a camada lipídica;
- ✚ Ou estão envolvidas no transporte através da formação de canais, apresentando uma estrutura em camadas β – ex.: porinas (aparecem na membrana externa das mitocôndrias e bactérias, permitindo a passagem de moléculas sem alteração da sua conformação, não envolvendo dispêndio de energia).

3.2. Estudo das proteínas da membrana

A membrana que apresenta um estudo mais avançado é a dos eritrócitos, na medida em que:

Existem em grande quantidade (permitindo obter membranas puras que são depois dissolvidas pelo SDS);

São anucleados;

Não têm organelos;

Os eritrócitos maduros não têm núcleo, não tem capacidade de sintetizar, mas apresentam mecanismos e enzimas que conseguem remover os produtos que são tóxicos para a célula. A forma anterior dos eritrócitos é a dos reticulócitos, onde se consegue observar RNA.

Inicialmente, os eritrócitos são conduzidos à plasmólise através da inserção numa solução hipotónica, obtendo-se membranas puras que serão sujeitas a electroforese em gel de poliacrilamida (onde as proteínas são separadas quanto à sua massa). Os tipos de proteínas encontrados são os seguintes:

✚ Espectrina

- Proteína mais abundante nos eritrócitos humanos;
- Possui cadeias α e β hélice (proteína fibrosa) que depois se unem em determinados pontos, formando uma rede de filamentos proteicos que constituem o citosqueleto (responsável pela forma das células);
- Formada por dímeros que se unem através da actina e da topomiosina formando tetrâmeros;
- Confere uma forma bicôncava aos eritrócitos
- A sua ligação com a banda 3 é feita por acção da anquirina, permitindo a conexão à membrana.

✚ Banda 3

- Proteína transmembranar que atravessa várias vezes a membrana;
- Proteína glicosilada, mais negativa que a glicoforina;
- Proteína transportadora, responsável pela deslocação do CO_2 nos pulmões.
- É um canal iónico que permite o transporte de CO_2 sob a forma de HCO_3^- que tem carga negativa. Por isso, este é trocado pelo ião Cl^- carregado negativamente, para que a célula não fique electricamente neutra.
- Surge associada à anquirina.

✚ Glicoforina

- Não tem função cientificamente definida;
- Proteína que atravessa uma única vez a membrana;
- Proteína altamente glicosilada;
- Apresenta um peso molecular semelhante ao da Banda 3.

✚ Banda 4.1

- Liga a glicoforina à actina;
- Responsável pela ligação à membrana.

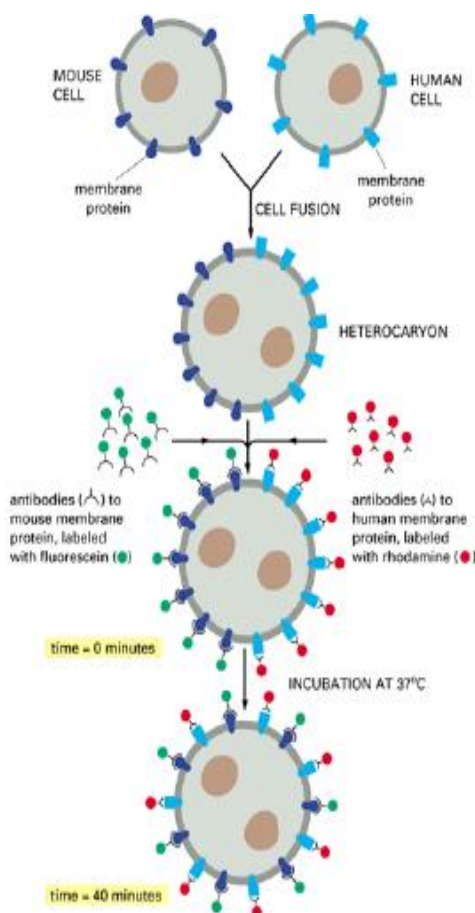
✚ Actina

- Responsável pela ligação à membrana.

✚ Anquirina

- Liga a espectrina à membrana, ligando-se à banda 3.

3.3. Mobilidade das proteínas ao longo da membrana

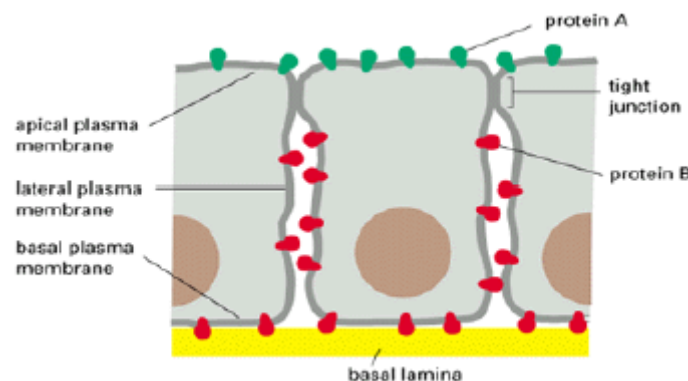


- 1) Recolha de uma célula de animal e de uma célula humana, e marcação de ambas com fluorocromos, com o objecto de obter uma boa visualização ao microscópio.
- 2) Fusão das duas células num meio de substâncias que permitem esta reacção – a célula que resulta da fusão designa-se por heterocário.
- 3) Marcação da membrana proteica do animal com fluorocromos verdes e da membrana proteica do ser humano com fluorocromos vermelhos, sendo que se encontram de lados opostos do heterocário.
- 4) Incubação do heterocário a 37°C durante 40 minutos, fazendo com que as proteínas das duas células sejam misturadas e sejam encontrados fluorocromos dos dois tipos espalhados por toda a membrana.

3.4. Restrição da mobilidade das proteínas

A mobilidade das proteínas não é permitida ao longo de toda a membrana nas células epiteliais e nos espermatozoides.

No caso das células epiteliais, acontece que existem, na zona apical, junções celulares designadas por **tight junctions** que fazem com que as proteínas de parte apical não se movimentam para a parte basal e vice-versa, pois são células polarizadas. Assim sendo, a função das membranas nesta zona tem de ser diferente das membranas da outra parte, sendo consideradas proteínas específicas.



4. Os açúcares da membrana

Os açúcares que podem ser encontrados na membrana são:

- ✚ Glicolípidos – associados a lípidos
- ✚ Glicoproteínas – associados a proteínas
- ✚ Proteoglicanos – existem no espaço intracelular e são constituídos por uma parte de açúcar com características especiais e por outra parte proteica.

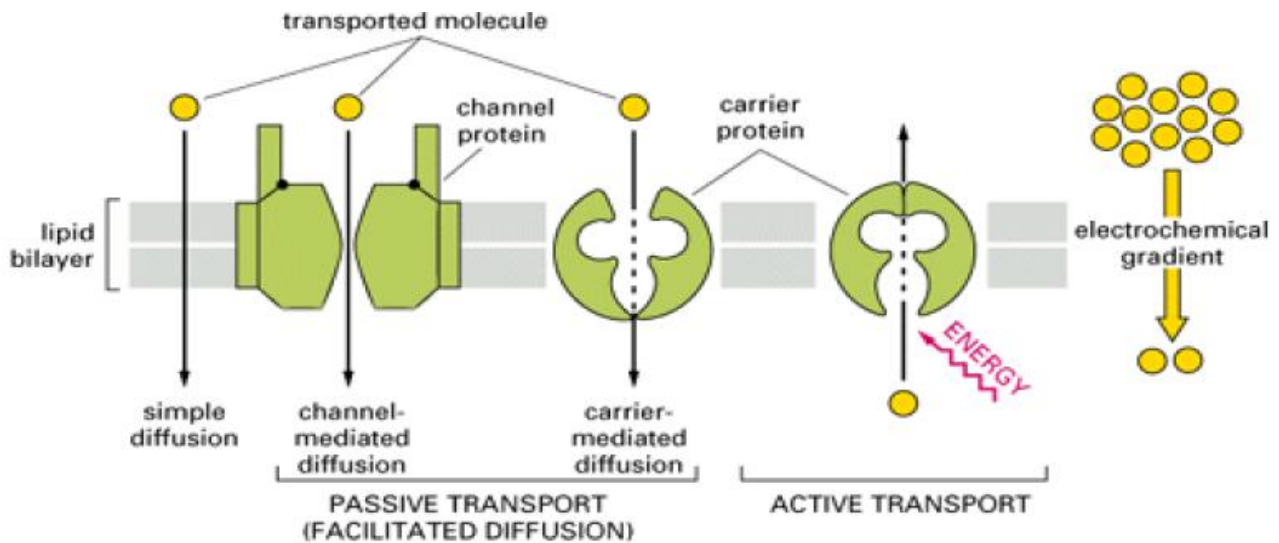
As proteínas e os lípidos podem sofrer glicosilação só em dois locais da célula: no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi. Daí que só as proteínas que vão ser sintetizadas no retículo é que podem sofrer glicosilação, porque de seguida vão para o complexo de Golgi onde podem:

- Sofrer multiplicação da cadeia oligossacarídica, que foi adicionada às células no retículo;
- Sofrer outra glicosilação.

Ora as proteínas que estão associadas ou sintetizadas no retículo vão ser transportadas para o complexo de Golgi através de vesículas e deste vão ser transportadas para a membrana ou para o exterior da célula, por vesículas. A vesícula funde-se com a membrana e o seu conteúdo passa para o exterior.

Para além disto, os açúcares da membrana encontram-se no lado não citosólico da membrana, constituindo o **glicocálice**. Na sua maior parte, estes açúcares são importantes no reconhecimento celular, como por exemplo quando os leucócitos atravessam os vasos sanguíneos porque existem células que expressam determinados açúcares que vão ser reconhecidos por proteínas na outra célula e vão permitir que as células comuniquem e atravessem a parede do capilar.

5. Transporte através da membrana

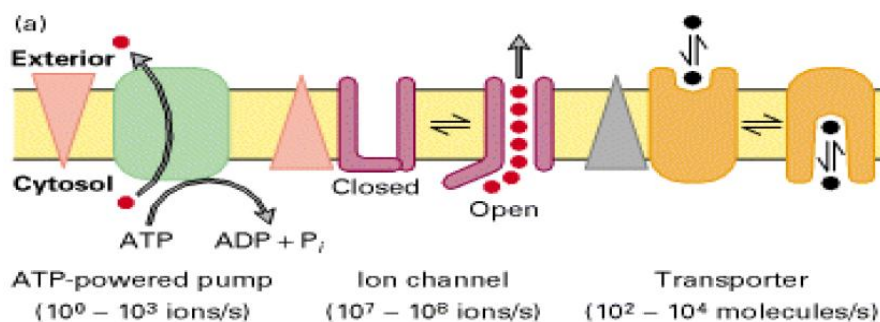


Transporte passivo – as moléculas passam a favor do gradiente de concentração através de determinadas proteínas (transportadoras ou canais), num processo espontâneo e sem qualquer gasto de energia.

Transporte activo – as moléculas são transportadas contra o seu gradiente de concentração.

Difusão simples – as moléculas passam a favor do gradiente de concentração e como são lipídicas ou polares não carregadas, de pequenas dimensões, conseguem atravessar determinadas membranas. No entanto, ocorre mais lentamente que o transporte passivo.

5.1. Proteínas envolvidas no transporte de moléculas



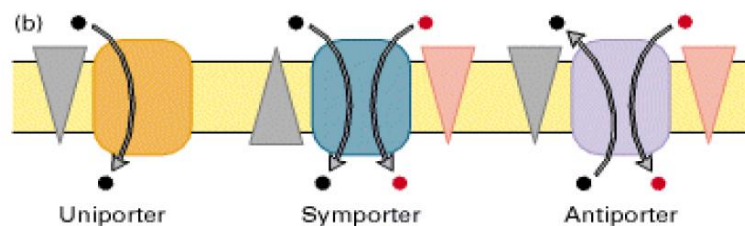
Bombas energéticas de ATP – proteínas que transportam a molécula contra o gradiente, com gasto de energia (transporte activo) – GTPases.

Proteínas canais – conforme o canal está aberto ou fechado, necessita de um estímulo para permitir a passagem das moléculas, são de dois tipos:

- **Púricas** – estão sempre abertas e o movimento é a favor do gradiente de concentração (permitem a passagem do potássio para dentro e para fora da célula).
- **Canais iónicos** – estão abertos ou fechados consoante as necessidades da célula, necessitando estas de estímulos para abrir (ocorrem alterações da voltagem, ligação a um ligando e stress mecânico).

Proteínas transportadoras – ligam-se ao soluto a transportar, alteram a conformação e deixam-nas passar, através de vários processos. A molécula transportada a favor do gradiente fornece energia para o transporte daquela que é transportada contra.

- ✚ **Uniporte** – transporte de solutos de um lado para o outro da membrana de forma simples, a favor do gradiente de concentração e num mecanismo de difusão facilitada.
- ✚ **Simporte** – transporte de moléculas contra o gradiente de concentração num mecanismo de transporte activo, em que a molécula a transportar e o ião são transportados no mesmo sentido, sendo um transportado a favor do gradiente e o outro contra (solute).
- ✚ **Antiporte** – transporte de moléculas também contra o gradiente de concentração, em que a molécula e o ião são transportados para lados opostos da célula, sendo um a favor do gradiente e o outro contra.



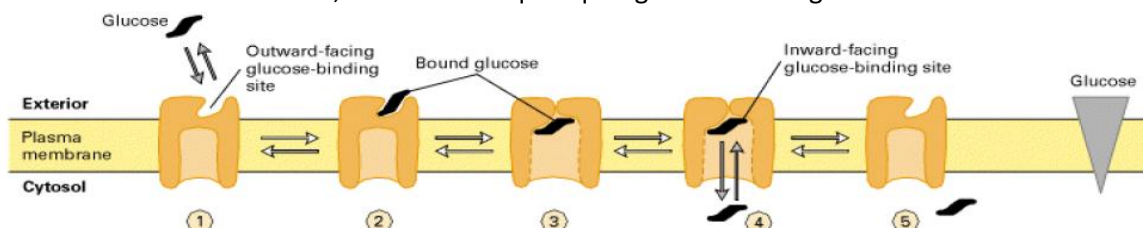
5.2. Transporte da glicose

A glicose é transportada através das membranas ainda que seja uma molécula polar e incapaz de se difundir nas membranas. Desta forma, pode atravessá-las por transporte activo ou passivo.

⇒ Transporte passivo

Este transporte, baseado na difusão facilitada, é responsável pela passagem da glicose das células epiteliais para o sangue. O transporte da glicose ocorre a favor do gradiente de concentração e através de transportadores da membrana, designados GLUT.

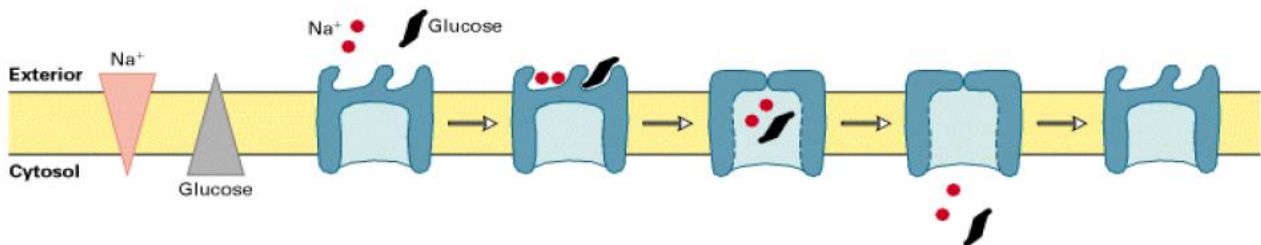
Quando a glicose se liga ao transportador, a configuração deste vai alterar-se e a glicose vai ser exposta do outro lado da membrana, não havendo quaisquer gastos de energia.



⇒ Transporte activo

Este transporte, não se dá conjuntamente com a hidrólise de ATP. É responsável pela passagem da glicose do lúmen intestinal até às células epiteliais contra o gradiente de concentração. A energia proveniente provém do cotransporte de Na^+ , que se encontra muito concentrado na zona extracelular e ao entrar na célula a favor do gradiente gera energia suficiente para transportar a glicose também para o interior da célula, mas contra o gradiente.

O transportador apresenta dois locais de ligação: um para o Na^+ e outro para a glicose. Este transporte activo está dependente do transporte activo primário (bomba de Na^+ e K^+), que mantém uma concentração de Na^+ baixa na zona intracelular e alta na zona extracelular, propícia para que ocorra o transporte. Caso não existissem iões Na^+ no exterior da célula, não vai haver o transporte de glicose contra o gradiente de concentração.



5.3. Bomba de sódio e potássio (ATPases tipo P)

A bomba de sódio e potássio é um complexo enzimático que permite o transporte de Na^+ de dentro para fora da célula e de K^+ de fora para dentro da célula. Funciona como uma bomba electrogénica, já que induz um dado potencial eléctrico ao saírem 3 catiões e entrarem apenas 2.

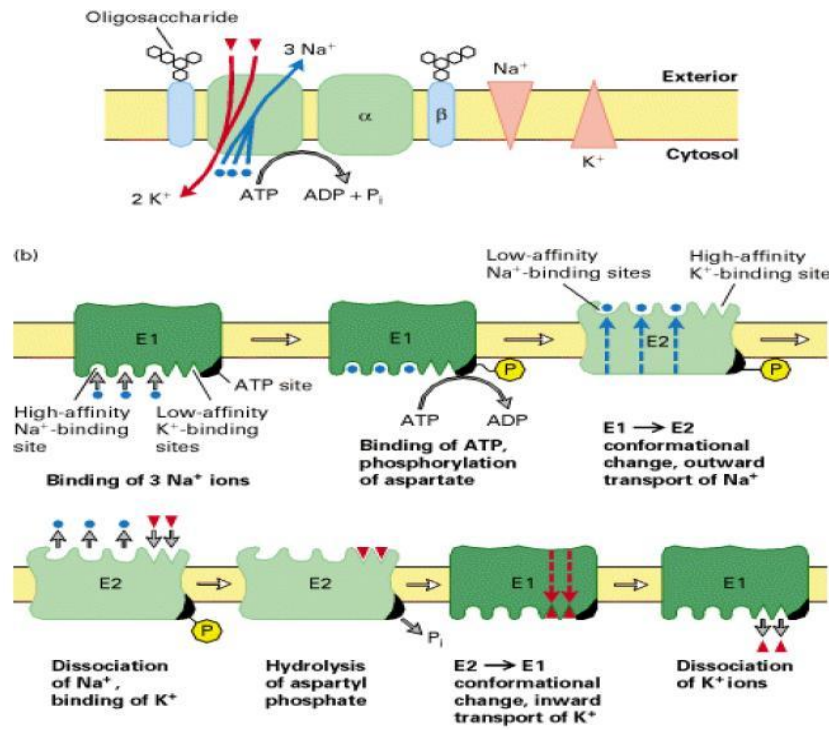
Para que o mecanismo ocorra são, então, necessários: Na^+ e ATP no citosol e K^+ no exterior da célula. A proteína transportadora tem um local de ligação para o Na^+ e outro para o K^+ . Por cada ATP hidrolisado são transportados 3 iões Na^+ para o exterior da célula e 2 iões K^+ para o interior, logo o lado interno fica mais negativo.

O transportador expõe a zona de ligação ao Na^+ para o interior da célula e este ião liga-se a ele. Simultaneamente, ocorre uma hidrólise de uma molécula de ATP a $\text{ADP} + \text{P}_i$. O P_i originado vai provocar a fosforilação do transportador, o que altera a sua conformação. Desta forma, ocorre a libertação do Na^+ na parte exterior da célula e a zona de ligação do K^+ é aí exposta.

Dá-se a ligação de dois iões K^+ a esta zona e a desfosforilação do transportador, que sofre uma nova alteração na sua conformação, readquirindo a configuração inicial, ou seja, expõe novamente os locais de ligação para o Na^+ no interior e para o K^+ no exterior, perdendo afinidade e libertando os iões K^+ para o interior da célula.

Este tipo de transporte para K^+ e Na^+ permite manter a pressão osmótica e, consequentemente, o volume da célula, regulando a concentração de solutos dentro e fora da célula. Os iões K^+ que entram na célula através da bomba saem constantemente dessa através de canais iónicos, tornando o fluxo de Na^+ e

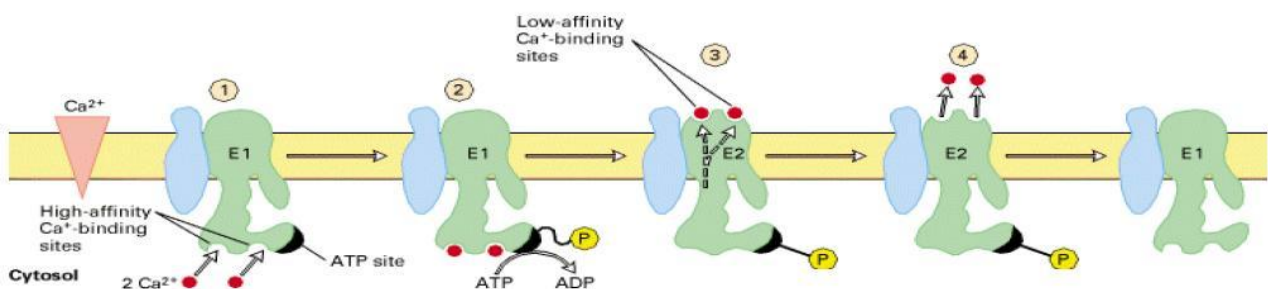
K^+ num fluxo contínuo. Para além disso, a célula recorre ao K^+ para neutralizar as cargas negativas das moléculas orgânicas. O Na^+ sai juntamente com moléculas de água para compensar a hipertonia causada pelos solutos orgânicos que tendem a reter a água no interior da célula.



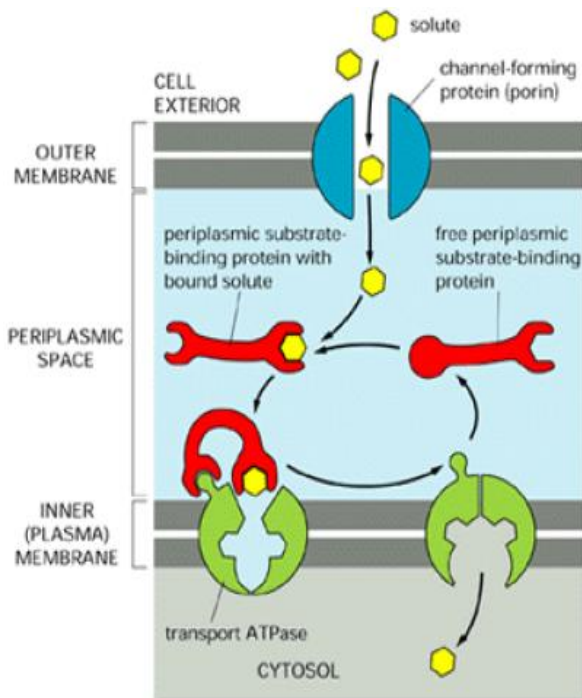
5.4. Bomba de cálcio (ATPases tipo P)

A bomba de cálcio é uma bomba que ocorre no retículo sarcoplásmico (existente nas células musculares) e em que há hidrólise de ATP. O Ca²⁺ é extremamente importante nas vias de sinalização celular em baixas concentrações no citosol, sendo que por mais pequenas que sejam as percentagens deste íon, desencadeia-se sempre um determinado conjunto de reacções.

O Ca²⁺ vai ser transportado contra o gradiente de concentração, sendo removido do citosol para o retículo sarcoplásmico. A bomba apresenta dois locais de alta afinidade para o Ca²⁺ e um local de ligação para o ATP. Ocorre hidrólise do ATP em ADP + P_i, alterando-se a conformação do complexo e fazendo com que os locais de baixa afinidade se orientem para o interior da célula e com que os íões Ca²⁺ sejam libertados para o exterior. De seguida, ocorre a desfosforilação do complexo, que volta a configuração inicial onde os locais de alta afinidade se encontram expostos para o citosol.



5.5. Transporte de moléculas através da dupla membrana das bactérias (ATPases tipo ABC)

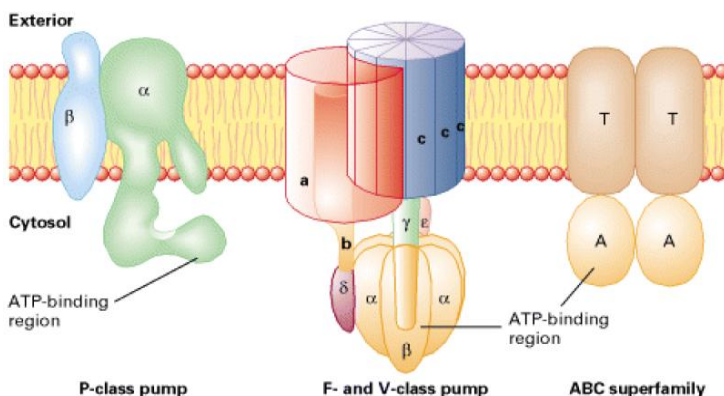


Na membrana externa existem proteínas canais que permitem a passagem das moléculas a favor do seu gradiente de concentração para o espaço intermembranar. Aqui, as proteínas periplásmicas reconhecem as moléculas de soluto, alteram a sua própria conformação e ligam-se às proteínas transportadoras situadas na membrana interna.

Como se tratam de ATPases do tipo ABC, o transporte tem de ser feito contra o gradiente de concentração, havendo gasto de energia. Assim, a molécula vai atravessar a membrana interna e passar para o interior da célula. Depois de a proteína transportadora libertar o soluto, separa também a proteína periplásmica da sua constituição, que fica livre para receber uma nova molécula proveniente do exterior.

Nos seres eucariotas, as células com este tipo de bombas, quando ligadas a determinados medicamentos, têm a capacidade de permitir a resistência a drogas devido ao transporte, do interior para o exterior, das moléculas de medicamentos recebidas.

5.6. Tipos de ATPases de transporte



Tipo P – relacionadas com o transporte dos iões Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e H^+ , sendo que para além da hidrólise de ATP, sofrem fosforilação.

Tipo F – transporte do ião H^+ que ocorre na membrana das mitocôndrias e dos cloroplastos, sintetiza e hidrolisa ATP consoante as necessidades da célula.

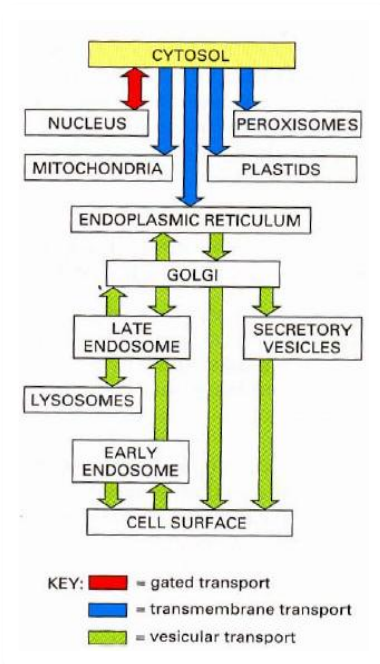
Tipo V – transporte de iões H^+ para o interior dos endossomas (vesículas celulares que têm a capacidade de ao sofrerem maturação se transformarem em lisossomas importantes para a digestão celular e em enzimas que vão permitir a degradação de todo o tipo de moléculas em $\text{pH} = 5$). Caso ocorra uma mutação nestas bombas, não há transporte de H^+ para os lisossomas, não se atinge um $\text{pH} = 5$ e as enzimas não efectuem a degradação das moléculas que lá chegam.

Tipo ABC – transporte de iões e moléculas pequenas, existindo essencialmente em bactérias e algumas células de mamíferos.

Capítulo 7 – Organização interna das células

1. Destino das proteínas

Todas as proteínas, ao apresentarem-se como sendo as principais moléculas responsáveis pelas funções da célula, excepto as das mitocôndrias e dos cloroplastos, iniciam a sua síntese no citosol. Mais tarde, ou se mantêm no citosol ou passam para o retículo endoplasmático.

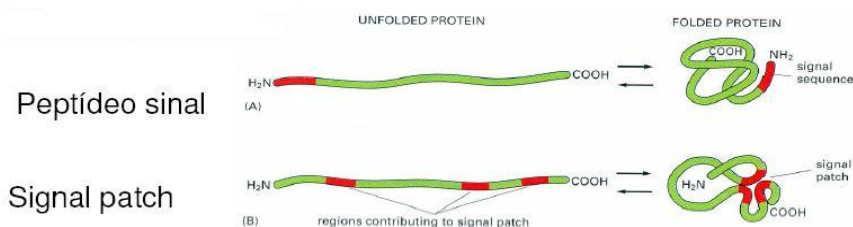


Existem determinados sinais que conduzem as proteínas para o seu destino final:

✚ **Peptídeos sinais** – sequências de aminoácidos no terminal amina ou carboxílico que indicam o destino das proteínas, sendo importantes para o funcionamento da molécula. Apresentam diferentes características consoante o organelo de destino da proteína:

- Mitocôndrias – aminoácidos carregados positivamente alternados com outros hidrofóbicos.
- Peroxisomas – sequência de aminoácidos no terminal carboxílico.
- Retículo Endoplasmático – sequência de aminoácidos no terminal amina ou noutras zonas da molécula.
- Núcleo – sequência de aminoácidos polares carregados positivamente.

✚ **Signal patch** – sinal conformacionado, constituído por uma sequência de aminoácidos não adjacentes mas em que a proteína ao enrolar, faz com que os aminoácidos fiquem juntos. As proteínas envolvidas nestes sinais vão para os lisossomos ou para o núcleo.

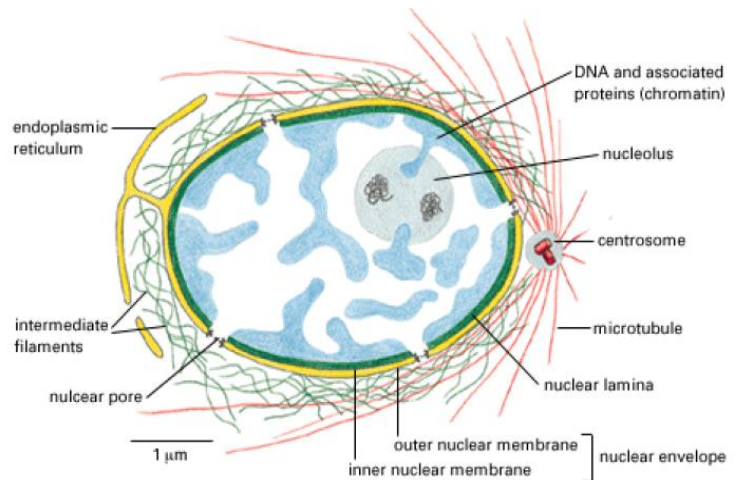


No citosol as proteínas podem sofrer alterações pós-tradução:

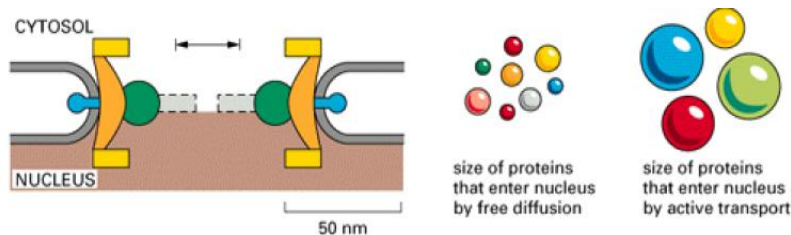
- ✚ Fosforilação
- ✚ Glicosilação – adição da N-acetilglucosamina a um resíduo da serina
- ✚ Ligação de coenzimas a algumas enzimas
- ✚ Ligação a ácidos gordos e incorporação na membrana (proteínas integrais)

2. Núcleo

O núcleo é delimitado do citoplasma por um sistema membranar denominado **invólucro nuclear**, constituído por uma dupla membrana com poros nucleares. No lado interno deste invólucro, situa-se a **lâmina nuclear**, constituída por filamentos intermediários altamente organizados, que confere forma ao núcleo e serve de ancoragem à cromatina. Na mitose ocorre a despolimerização dos filamentos, sempre depois da fosforilação das lâminas. No núcleo, encontra-se o património genético da célula, sob a forma de moléculas de DNA que quando associado a histonas, forma a cromatina, que se espalha pelo interior do núcleo. Para além da cromatina, identifica-se uma outra estrutura, o **nucleólo**, que representa o local de biossíntese de ribossomas.



Os **poros nucleares** são revestidos por proteínas (**nucleoporinas**) que reconhecem peptídeos sinal (ricos em arginina e lisina) ou *signal patches* das proteínas a transportar.



No transporte de moléculas entre o núcleo e o citosol (e vice-versa) intervêm as seguintes proteínas e sinais:

NLS – *nuclear localization signal* – peptídeo sinal que indica que a proteína vai para o núcleo

NES – *nuclear export signal* – peptídeo sinal que indica que a proteína vai para o citosol

Ran-GDP – existente no citosol / **Ran-GTP** – existente no núcleo

Ran-GAP – *GTPase activating protein* – permite a hidrólise do GTP no citosol

GEF – permite a passagem do GDP a GTP no núcleo

Importinas α e β – importam moléculas para o núcleo, reconhecendo o NLS

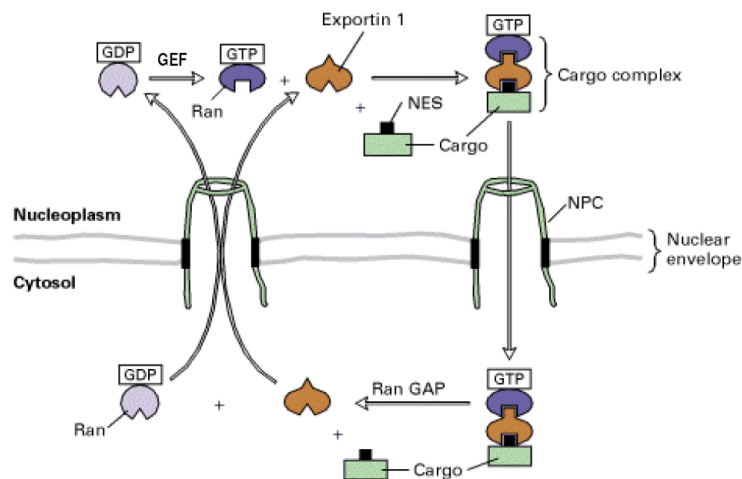
Exportinas – reconhecem as proteínas que vão para o citosol, através do NES.

2.1. Transporte de moléculas entre o núcleo e o citosol

A **proteína** que vai ser transportada para o citosol tem consigo um sinal de exportação nuclear – o **NES** -. Este sinal vai ser reconhecido pela **exportina** existente no núcleo e que necessita de estar associada à **Ran-GTP** para formar um complexo com a proteína desejada.

Assim que o complexo fica formado, é reconhecido pelas **nucleoporinas** (NPC) presentes no envelope nuclear e passa para o citosol. Aqui, para a proteína ficar livre no local desejado, tem de sofrer separação dos restantes componentes do complexo. Desta forma, o GTP é hidrolisado a GDP através da **Ran-GAP** e ocorre a separação dos três componentes: Ran-GDP, exportina e proteína.

A proteína permanece no citosol, a exportina passa novamente para o núcleo depois de ser reconhecida pelas nucleoporinas para uma nova passagem, e a Ran-GDP também passa novamente para o núcleo para que seja substituída em GTP através do **GEF**, na medida em que o Ran só fica activo ligado a GTP e não a GDP.

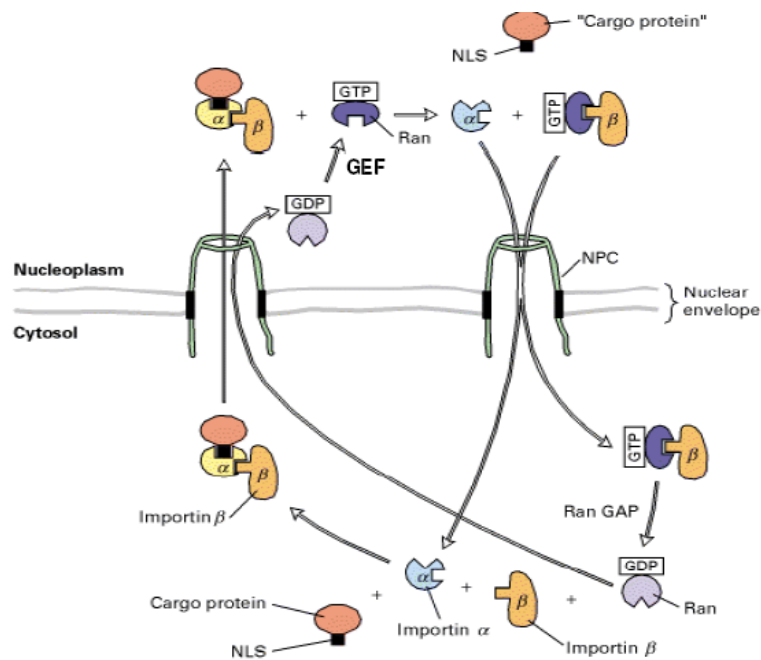


2.2. Transporte de moléculas entre o citosol e o núcleo

A **proteína** apresenta um sinal de localização nuclear (**NLS**) que vai ser reconhecido por importinas α e β . A **importina α** vai reconhecer o sinal existente na proteína e liga-se a ela e, por sua vez, a **importina β** vai ligar-se à importina α .

Quando as importinas reconhecem a NLS, ligam-se à proteína, formam o complexo e passam pelo poro nuclear, uma vez que são reconhecidas pelas **nucleoporinas**, e chegam ao núcleo.

Aqui, a **Ran-GTP** (obtida pela transformação da Ran-GDP através do RCC1) actua sobre o complexo pois reconhece a importina β , e dissocia a importina α e a proteína, mas mantém-se ligado à importina β . Desta forma, num processo seguinte, as importinas passam ambas para o citosol, onde a importina β sofre a acção da **Ran-GAP**, hidrolisando a Ran-GTP a **Ran-GDP** e libertando finalmente a importina β para o citosol. Por sua vez, a Ran-GDP passa imediatamente para o núcleo através do poro nuclear para ficar pronta para um novo processo.

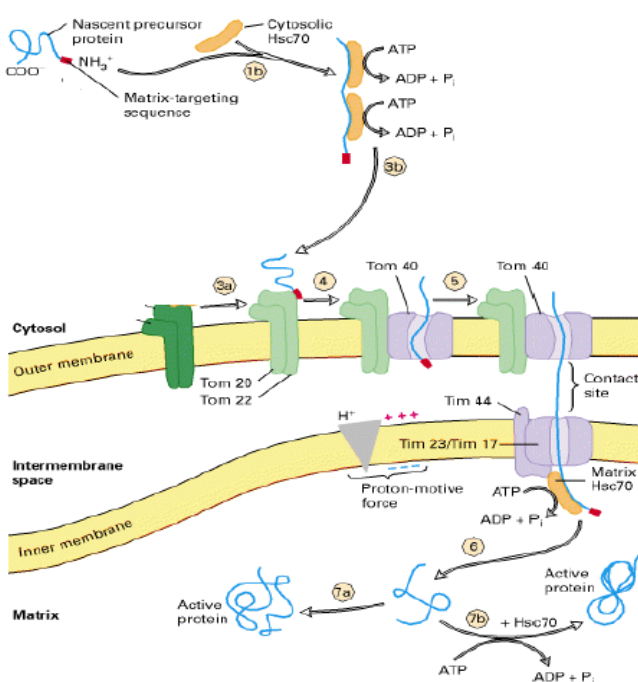


3. Transporte mitocondrial

As proteínas das membranas mitocondriais que estão envolvidas no transporte de proteínas são:

- ✚ **Tom** – translocadores da membrana externa
- ✚ **Tim** – translocadores da membrana interna
- ✚ **Oxa** – translocadores da membrana interna que permitem a inserção na membrana interna das proteínas sintetizadas no citosol ou na mitocôndria.

3.1. Transporte de proteínas para a matriz mitocondrial



A **proteína** nascente a ser transportada para o núcleo apresenta um peptídeo sinal no seu terminal amina. Depois de atravessar várias hidrólises de ATP, atinge a membrana externa da mitocôndria, onde se encontram os translocadores externos – **Tom** – . No entanto, a proteína não pode estar na sua conformação nativa, sendo necessário que a ela se liguem chaperões assim que termina a sua síntese, havendo gasto de energia através de ATP.

O peptídeo sinal da proteína é reconhecido pelo Tom 22 para que possa ultrapassar a membrana externa através do Tom 40 que é uma proteína canal. No espaço intermembranar, existem vários pontos de contacto entre as duas membranas, por onde a proteína nascente vai

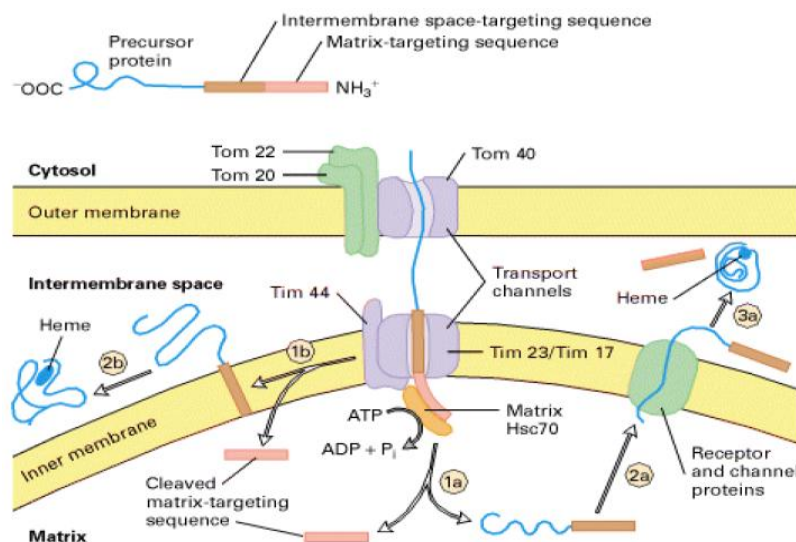
prosseguir o seu percurso. Para que a proteína chegue à matriz mitocondrial, tem de atravessar a membrana interna da mitocôndria, onde existem os translocadores internos – **Tim** –, sendo que assim que inicia o processo de passagem pelo espaço intermembranar, os chaperões desligam-se da proteína.

Assim que a proteína chega à matriz, novos chaperões voltam a ligar-se por mais uma hidrólise de ATP em ADP + Pi. Desta forma, só quando toda a proteína se encontra na matriz mitocondrial é que o peptídeo sinal é retirado por **peptidases** e os chaperões desligam-se, libertando a proteína e permitindo que ela adquira a sua conformação normal e a função biológica respectiva.

3.2. Transporte de proteínas para o espaço intermembranar

Neste caso, a proteína para além do peptídeo sinal que indicava para a matriz mitocondrial, tem outro que indica para o espaço intermembranar. Assim, inicialmente a proteína passa para a matriz pelo processo explicado anteriormente (3.1.) e só depois é que prosseguem para o destino final.

Assim que a proteína chega à matriz, é confrontada com a acção de chaperões para impedir que ela consiga adquirir uma conformação errada. De seguida, o peptídeo sinal que conduzia a proteína para a matriz é retirado por acção de peptidases e a proteína é encaminhada para a membrana interna da mitocôndria. Aqui, a proteína fica presa, mas só até que o peptídeo sinal que encaminhava a proteína para o espaço intermembranar seja retirado e a cadeia peptídica seja libertada para o espaço intermembranar, onde adquire a conformação nativa.



3.3. Transporte de proteínas para a membrana interna

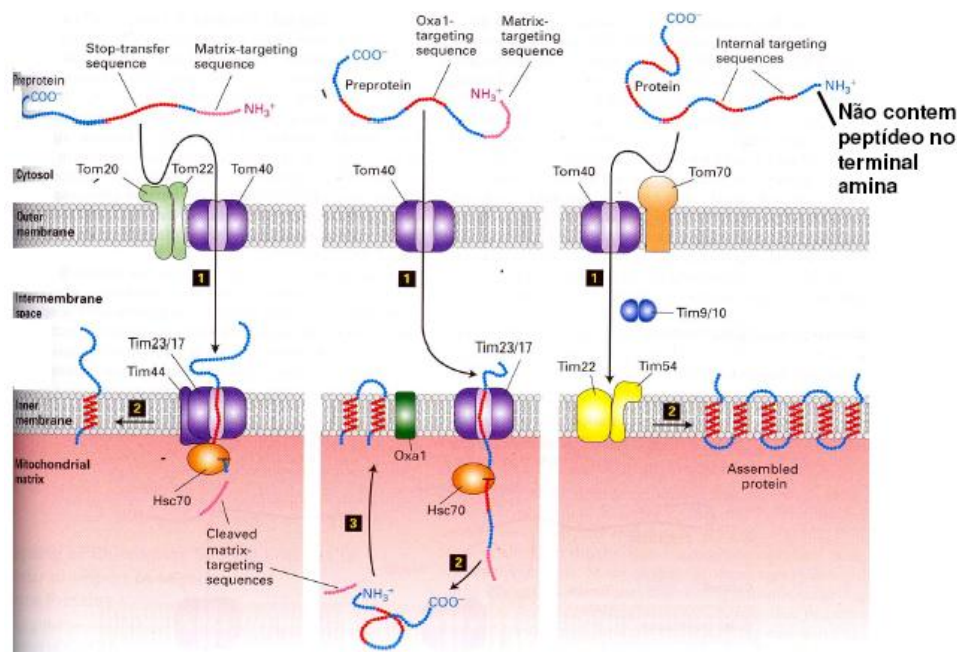
No caso da proteína ser destinada para a membrana interna da mitocôndria, podem existir três casos possíveis:

1) A proteína é constituída por dois peptídeos sinais: um que indica que a proteína vai para a matriz e um sinal *stop-transfer* que induz uma interrupção na deslocação da proteína. A proteína atravessa o processo descrito em (3.1.) até ao momento em que a proteína chega aos translocadores internos (Tim).

Aqui, o segundo peptídeo sinal é reconhecido e a proteína fica presa à membrana interna devido à ausência de peptidases que reconheçam a sequência do peptídeo sinal a ser cortada.

2) A proteína apresenta um peptídeo sinal que conduz a proteína para a matriz e um outro que se relaciona com os translocadores Oxa. A proteína segue todo o processo (3.1.), sendo que na matriz o primeiro peptídeo sinal é retirado normalmente e o segundo vai ser reconhecido pelo Oxa1. Assim, a proteína adere à membrana interna onde fica presa, e com os dois terminais virados para a matriz.

3) A proteína não apresenta peptídeo sinal no terminal amina, mas apresenta vários peptídeos sinais ao longo da cadeia peptídica. Assim, ao longo do processo (3.1.), a proteína não consegue passar através do canal Tim, ficando presa à membrana interna, e enrolando-se tantas vezes quantos peptídeos sinais tiver na sua constituição. Neste caso, os dois terminais ficam virados para o espaço intermembranar.



4. Peroxissomas

Os peroxissomas são organelos citoplasmáticos limitados por uma membrana. Do seu conteúdo destacam-se enzimas oxidativas, como a urato oxidase. As reacções de oxidação catalizadas por estas enzimas produzem peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que é utilizado pela **catalase** (outra enzima abundante no peroxissoma) para oxidar um conjunto de outros substratos, tais como fenóis, ácido fórmico, formaldeído e álcool.

Outra importante função dos peroxissomas consiste na beta-oxidação dos ácidos gordos em acetil-CoA. Possivelmente, o peroxissoma representa o vestígio de um organelo primitivo, responsável por metabolizar o oxigénio antes do aparecimento das mitocôndrias. Tal como as proteínas mitocondriais, as proteínas

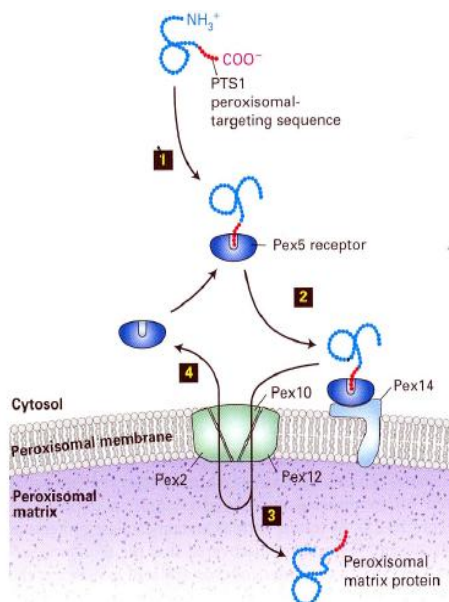
destinadas ao peroxissoma são sintetizadas por ribossomas do citosol e depois dirigidas para peroxissomas pré-existentes mediante a presença de sinais específicos.

Nas plantas, os peroxissomas podem existir nas folhas onde intervêm na fotorespiração ou nas sementes germinativas, onde transformam ácidos gordos em ácido succínico que, mais tarde, é transformado em açúcares (glioxissomas).

4.1. Transporte de proteínas do citosol para os peroxissomas

Nos peroxissomas, as proteínas, ao contrário do caso das mitocôndrias, encontram-se na sua conformação activa e vão atravessar a membrana com estas características. Apresentam um único peptídeo sinal no terminal carboxílico que vai ser reconhecido pelas **Pex5**, que são proteínas citosólicas.

Os receptores da membrana reconhecem o Pex5 e permitem a passagem da proteína para o interior do peroxissoma onde a proteína e o Pex5 se dissociam.



5. Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático é constituído por um labirinto intracelular de cisternas, delimitadas por membranas. Parte destas cisternas estão revestidas por ribossomas e denominam-se retículo endoplasmático rugoso. Outra parte não se associa a ribossomas e denomina-se retículo endoplasmático liso.

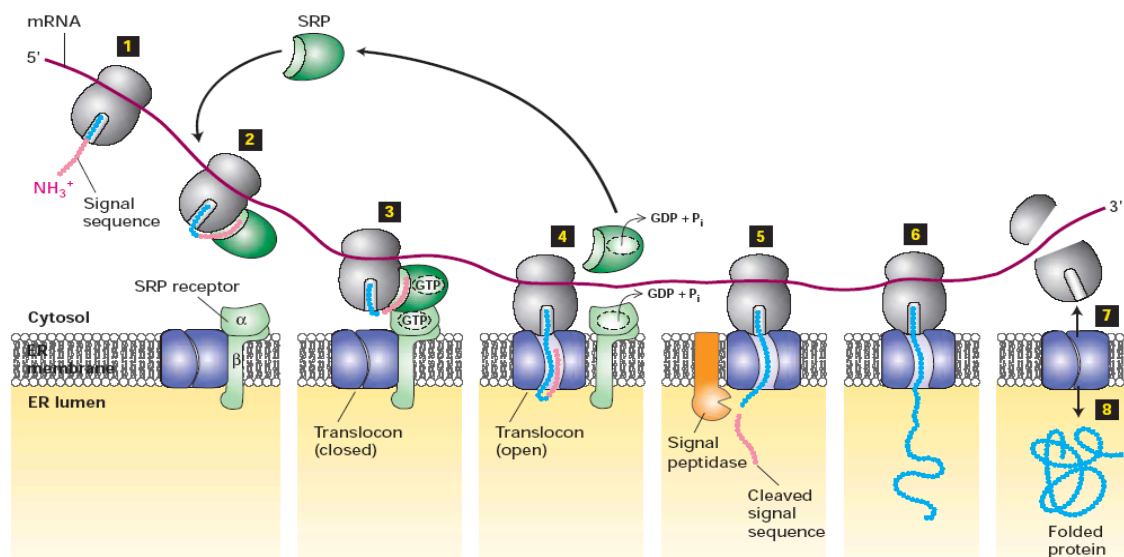
O **retículo endoplasmático rugoso** é responsável pela síntese de todas as proteínas secretadas para o exterior da célula, bem como de todas as proteínas transmembranares e das enzimas lisossómicas. Na realidade, a síntese destas proteínas inicia-se em ribossomas localizados no citosol. No entanto, estas proteínas distinguem-se das restantes por possuírem um sinal que consiste numa sequência específica de aminoácidos.

O **retículo endoplasmático liso** é escasso na maioria das células. No entanto, este compartimento encontra-se particularmente desenvolvido em certos tipos especializados de células. É o caso das células do

fígado, células musculares e células produtoras de hormonas esteróides. O retículo liso é também o local de acumulação de enzimas responsáveis pela síntese de hormonas esteróides a partir do colesterol e, por isso, encontra-se muito desenvolvido nas células produtoras deste tipo de hormonas. Finalmente, o retículo liso contém proteínas de transporte e sequestro de cálcio, e por isso é muito abundante nas células musculares.

Microsomas – vesículas resultantes da homogeneização das células. Os microsomas lisos resultam do retículo liso, do complexo de Golgi, da membrana, etc.. Depois da centrifugação, os microsomas rugosos separam-se facilmente dos lisos porque a sua densidade é bastante superior. Através do estudo destas vesículas, pode concluir-se sobre a forma como as proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático.

5.1. Síntese de proteínas e a sua translocação através da membrana do RE



Assim que o peptídeo sinal do retículo endoplasmático chega ao ribossoma, é ligado a uma proteína que o reconhece (o SRP). O SRP entrega o ribossoma com a proteína nascente ao receptor da SRP que se situa na membrana do retículo endoplasmático. Esta interacção é reforçada pela ligação de uma molécula de GTP tanto ao SRP como ao seu receptor.

A transferência da proteína nascente até ao transportador canal da membrana do retículo endoplasmático está relacionada com a abertura desta molécula e com a inserção do peptídeo sinal e do segmento adjacente à proteína em crescimento.

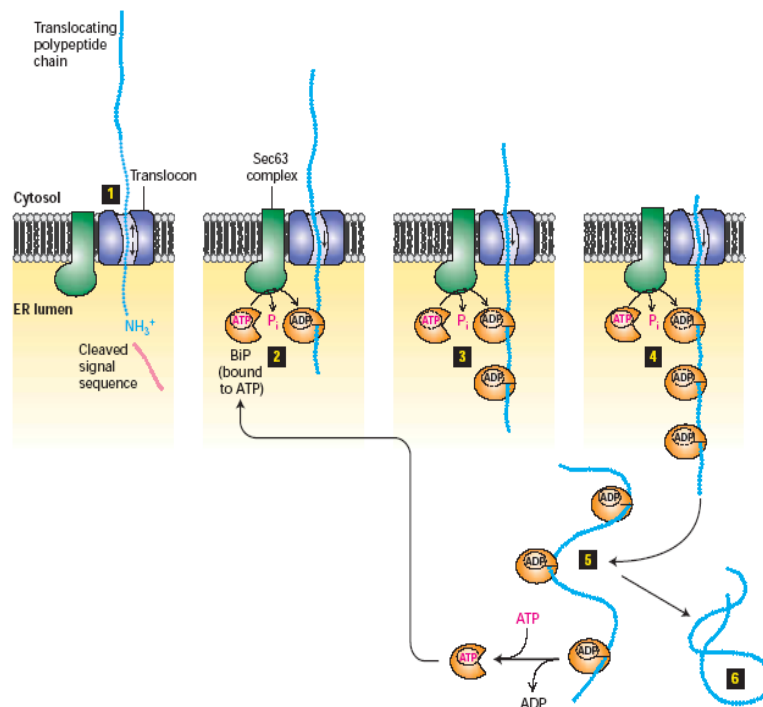
O SRP e o seu receptor dissociam-se da proteína canal, o GTP hidrolisa-se e seguidamente reúnem-se todas as condições necessárias para a inserção de uma outra cadeia polipeptídica. À medida que a cadeia cresce, passa através da proteína canal para o lúmen do retículo endoplasmático, onde o peptídeo sinal é cortado por uma peptidase e é rapidamente degradada. A cadeia peptídica continua a elongar-se à medida que o mRNA é transcrito em direcção à extremidade 3'. Como o ribossoma se encontra anexado à proteína canal, a cadeia em crescimento é expulsa através dela para o lúmen do retículo endoplasmático.

Por fim, quando a transcrição está completa, o ribossoma é libertado e o que resta da cadeia peptídica passa também para o lúmen do retículo, fechando a proteína canal e conferindo a conformação nativa à proteína sintetizada.

Nota: Algumas proteínas secretoras entram no lúmen do retículo endoplasmático depois da transcrição estar completa. Nestes casos, o transporte também é condicionado por um complexo proteico adicional, da família dos chaperões, designado **BiP**.

Este complexo é embebido na membrana junto à proteína canal, onde é reconhecido pelo lúmen do retículo endoplasmático. Tal como os outros chaperões, o BiP possui um domínio peptídico e um domínio de ATPase. Assim que o terminal amina da proteína chega ao lúmen do retículo endoplasmático, a peptidase corta o peptídeo sinal. A interacção do BiP-ATP com a restante porção lumínica da proteína provoca a hidrólise do ATP, produzindo uma alteração conformacional no BiP.

De seguida, o BiP-ADP obtido permanece ligado à cadeia proteica, induzindo uma sequência de hidrólises de ATP que permite a ligação de vários complexos BiP-ADP à molécula, até que toda ela esteja no lúmen do retículo. Quando isto acontece, as moléculas de BiP trocam espontaneamente o ADP por ATP, levando à libertação do polipeptídeo que vai adquirir a sua conformação nativa.

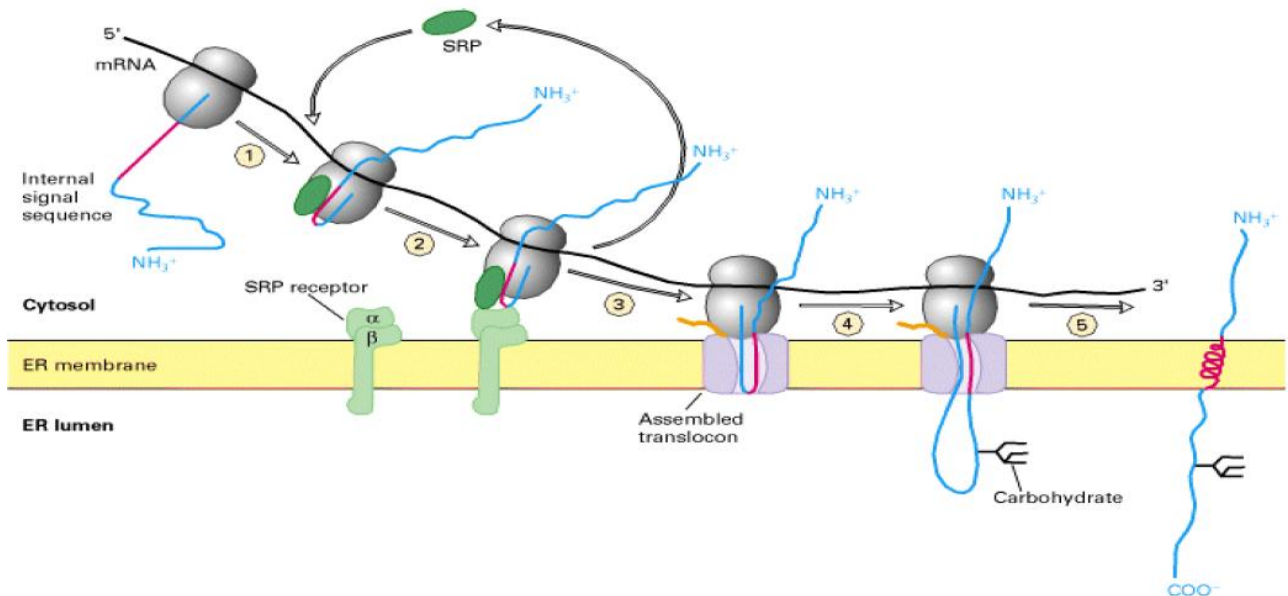


5.2. Síntese de proteínas transmembranares

As proteínas nem sempre apresentam um peptídeo sinal no terminal amina. A proteína transmembranar é um destes casos, fazendo com que essa parte da molécula fique virada para o lado citosólico e deixe de ser reconhecida pelo translocador.

O reconhecimento é feito a um sinal situado no meio da proteína, através de um SRP e depois por um translocador. Como o terminal amina não conseguiu penetrar no interior do retículo endoplasmático, a

passagem fica impedida e a síntese da proteína continua. No final, o terminal amina indica que o destino é o retículo e que passava para o lúmen. No entanto, a síntese continua até que o outro peptídeo sinal se localize na membrana, onde vai ficar alojado e onde faz com que o terminal amina fique virado para o lado citosólico e o terminal carboxílico para o lúmen.



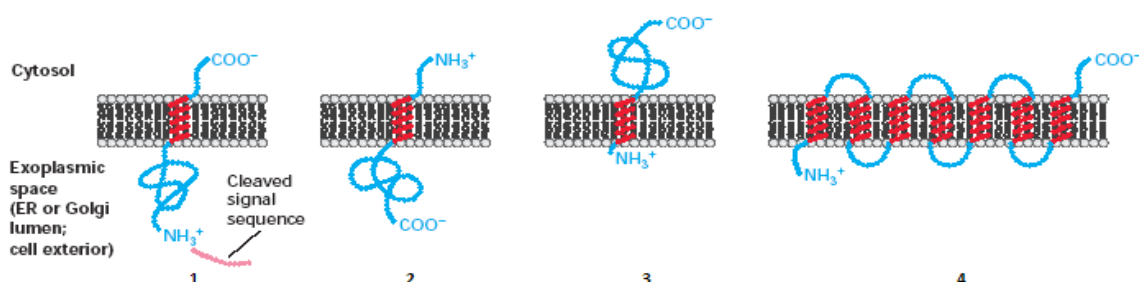
Existem quatro tipos de proteínas transmembranares:

Tipo 1 – apresentam um peptídeo sinal do terminal amina e estão ligadas à membrana com o seu terminal amina virado para o lúmen e com o terminal carboxílico virado para o citosol.

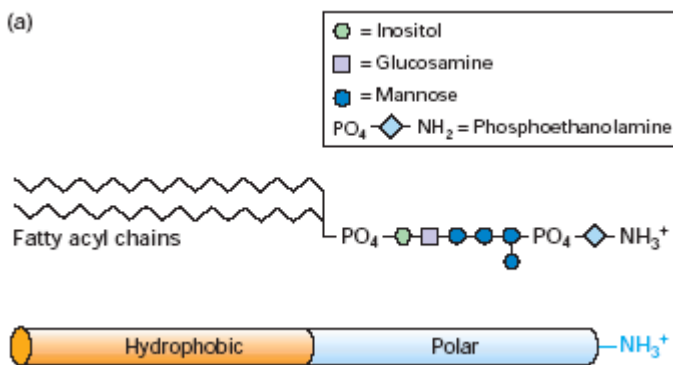
Tipo 2 – não possuem peptídeos sinais no terminal e estão orientadas ao contrário das anteriores: com o terminal amina para o citosol e o terminal carboxílico para o lúmen.

Tipo 3 – apresentam a mesma orientação das tipo 1, mas não apresentam peptídeo sinal no terminal. Estas diferenças na topologia reflectem os diferentes mecanismos utilizados pela célula para estabelecer a orientação da membrana dos segmentos transmembranares.

Tipo 4 – contêm múltiplos peptídeos sinais ao longo da cadeia proteica e nenhum no terminal, fazendo com que a proteína apresente tantas hélices transmembranares quantos peptídeos sinais tiver. As proteínas tipo 4 aqui representadas correspondem às proteínas com receptores tipo G que a orientam com o terminal amina para o lúmen e com o terminal carboxílico para o citosol. No entanto, existem proteínas tipo 4 que podem ter um número diferente de hélices e adquirir várias orientações para os terminais.

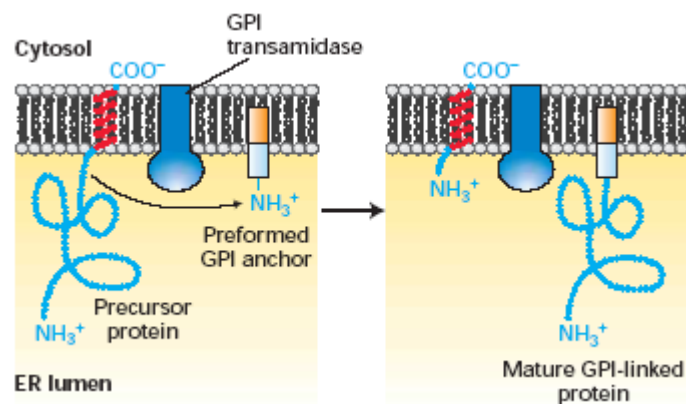


5.3. Síntese de proteínas ligadas ao GPI (glicosilfosfatidilinositol)



Algumas proteínas da superfície celular encontram-se ligadas à bicamada fosfolipídica não por uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos, mas sim por uma molécula anfipática covalentemente ligada, o GPI (glicosilfosfatidilinositol). Esta molécula é constituída por uma parte hidrofóbica que contém cadeias de ácidos gordos e uma parte polar que contém resíduos de hidratos de carbono e grupos fosfato.

Estas proteínas são sintetizadas e inicialmente ancoradas à membrana do retículo endoplasmático, precisamente como as proteínas transmembranares tipo I, com o peptídeo sinal do terminal amina. No entanto, uma pequena sequência de aminoácidos situada no domínio do lúmen, adjacente à membrana, é reconhecido por uma **transamidase** localizada no interior da membrana do retículo. Esta enzima corta o interior da proteína precursora, deixando-a dividida em duas partes: a primeira fica anexada à membrana do retículo com a configuração referida anteriormente e a segunda vai ligar-se a um ponto de ligação do GPI que também se situa na membrana. Assim, esta proteína adquire a sua maturação ligada a esta molécula.

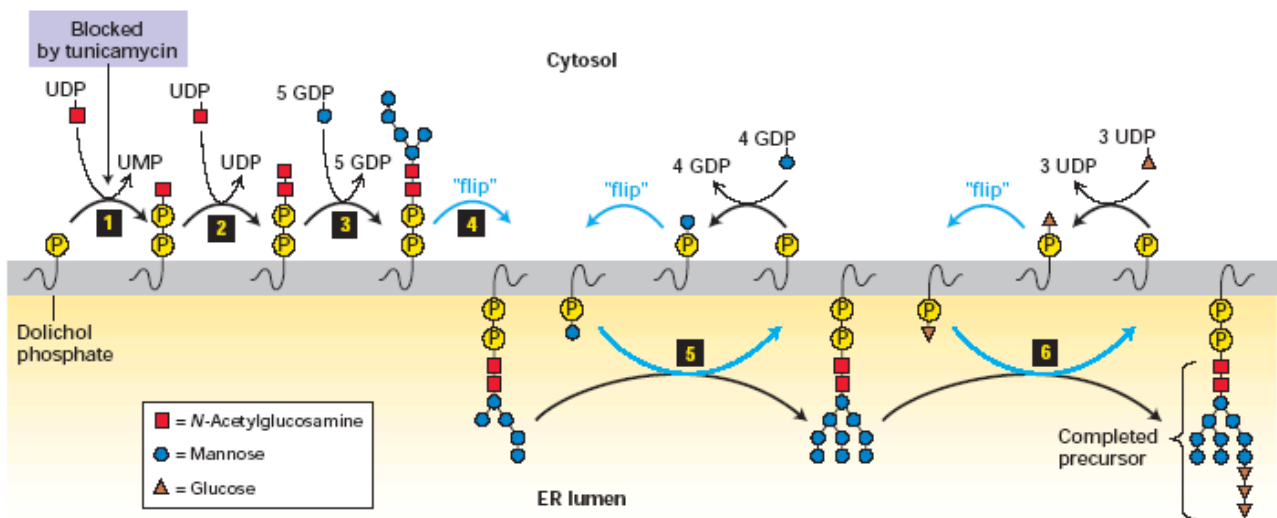


5.4. Síntese da cadeia oligossacarídica

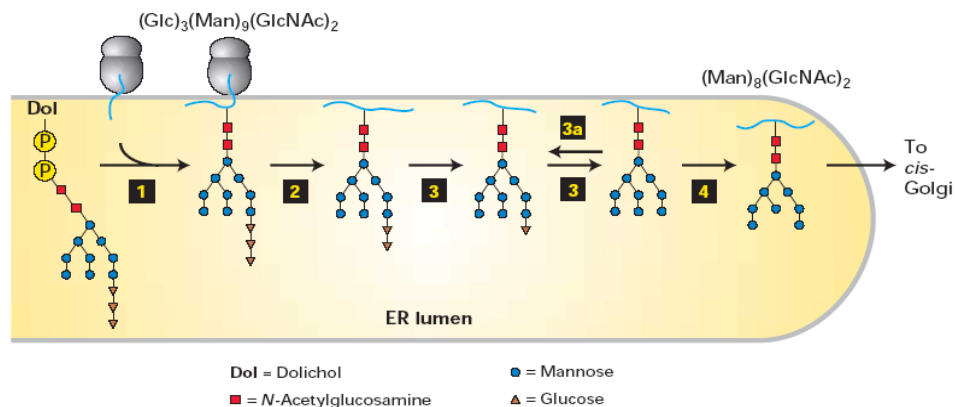
O **dolicolfosfato** é um lípido fortemente hidrofóbico, que contém aproximadamente 95 átomos de carbono e que se encontra embebido na membrana do retículo endoplasmático. Duas moléculas de **N-acetilglucoseamina** e cinco de **manose** são adicionadas uma a uma ao dolicolfosfato, na face citosólica da membrana do retículo.

Os dadores de **UDP** (uridinadifosfato – nucleótido) presentes nestas e noutras reacções seguintes são sintetizados no citosol. Assim, o primeiro resíduo de açúcar é adicionado ao dolicolfosfato através de uma ligação extremamente energética. A **tunicamicina** que bloqueia a primeira enzima neste percurso, vai inibir a síntese de todos os oligossacarídeos nas células.

Depois de o dolicolfosfato com os 7 resíduos de açúcar sofrer flip-flop, passa para o lúmen do retículo, onde as 4 manoses restantes são adicionadas uma a uma, juntamente com 3 moléculas de glicose. Nas reacções seguintes, o açúcar a ser adicionado é inicialmente transferido de um UDP para um transportador de dolicolfosfato situado no lado citosólico. O transportador sofre então flip-flop para a face do lúmen e o açúcar é transferido para o oligossacarídeo crescente. Por fim, o transportador volta a sofrer flip-flop e volta novamente para o lado citosólico.



O precursor completo no processo anterior é transferido do transportador dolicol para um susceptível resíduo de asparagina que se encontra numa proteína nascente, assim que a asparagina passa para o lado do lúmen do retículo endoplasmático.



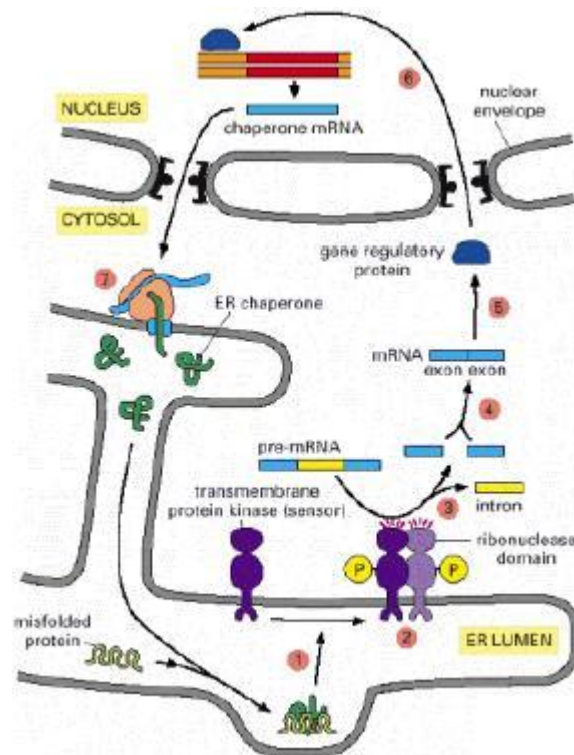
5.5. Acumulação de proteínas com conformação errada no R.E.

A acumulação de proteínas ocorre com grande quantidade de chaperões, logo é necessário enviar um sinal à célula para que ela consiga sintetizá-los em quantidade suficiente.

Estas proteínas com conformação errada enviam sinais a proteínas transmembranares que funcionam como cinases, sofrendo auto-fosforilação. Esta cinase activa transforma-se numa riboendonuclease que vai cortar moléculas específicas de pré-mRNA em dois locais, removendo os intrões

e formando uma molécula de RNA no citosol. Esta molécula activa de mRNA vai ser traduzida para originar uma proteína que vai actuar como factor de transcrição.

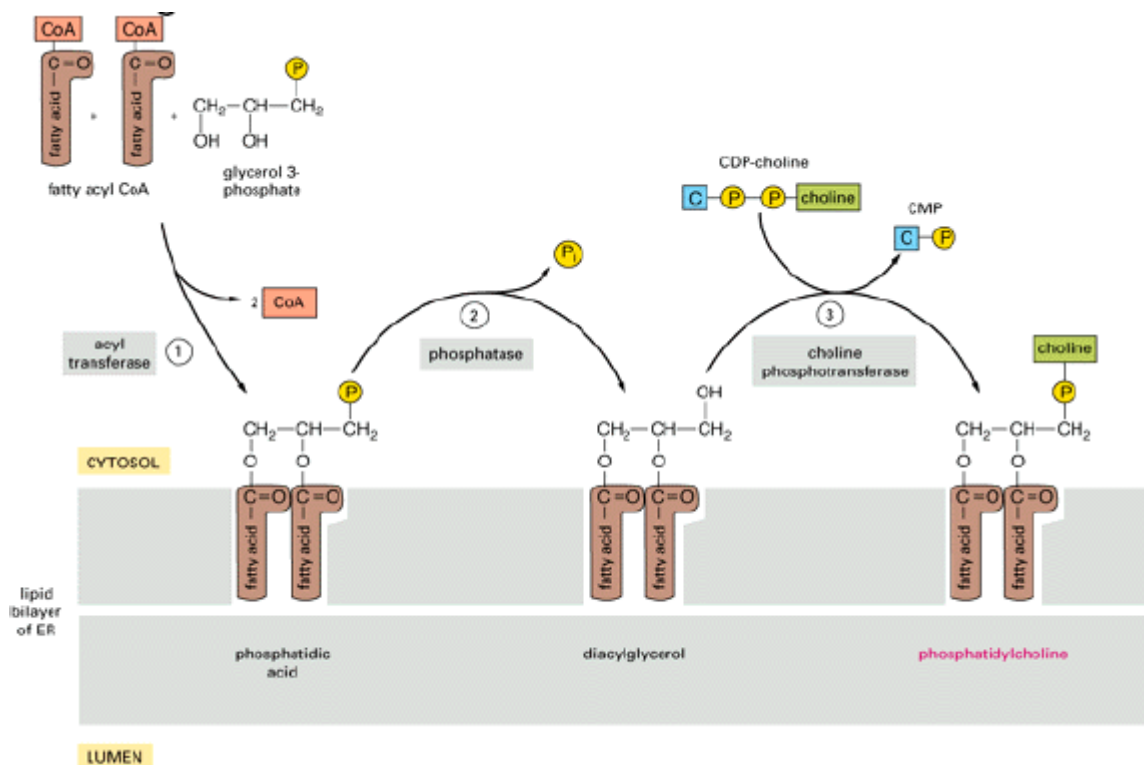
Estes factores vão ligar-se a um determinado gene e induz a sua activação, provocando uma síntese de uma molécula de mRNA e sendo transportado para o núcleo através do reconhecimento por importinas. Por fim, codificam-se os chaperões do retículo endoplasmático que ao serem produzidos no retículo endoplasmático, ajudam as proteínas a adquirir a sua conformação.



5.6. Fosfoglicérideos no retículo endoplasmático

⇒ Síntese

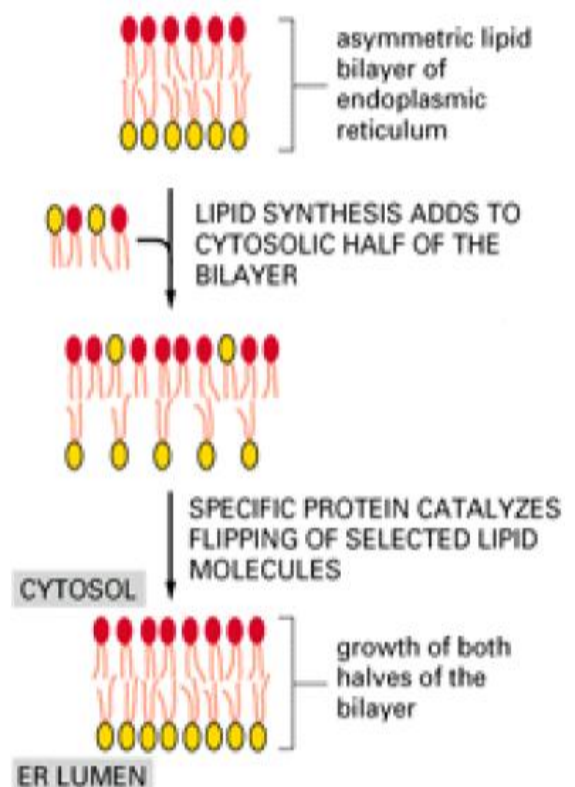
A síntese de fosfolípideos no retículo endoplasmático ocorre no lado citosólico da membrana do retículo endoplasmático. O principal fosfolípido sintetizado é a fosfatidilcolina, que pode ser formado em três etapas, a partir de colina, dois ácidos gordos e glicerolfosfato. Cada etapa é catalisada por enzimas na membrana do retículo endoplasmático que têm os seus centros activos voltados para o citosol, onde são encontrados todos os metabólitos necessários. Assim, a síntese de fosfolípideos ocorre exclusivamente na lâmina citosólica da membrana do retículo endoplasmático.



⇒ Flip-flop dos fosfoglicerídeos

Pelo facto de a síntese lipídica ocorrer na metade citosólica da bicamada do retículo endoplasmático, existe a necessidade de um mecanismo que transfira algumas das moléculas fosfolipídicas recém-formadas à lâmina do lúmen da bicamada. Nas bicamadas lipídicas sintéticas não existe um mecanismo de transferência de moléculas recém-sintetizadas para o lúmen.

No retículo, todavia, os fosfolipídeos equilibram-se através da membrana em minutos, o que é quase cem mil vezes mais rápido que o *flip-flop* espontâneo. Este movimento transbicamada rápido parece ser mediado por um transportador de fosfolipídeo denominado “misturador”, que equilibra fosfolipídeos entre as duas lâminas da bicamada lipídica, fazendo com que os diferentes tipos de fosfolipídeos pareçam estar distribuídos igualmente entre as duas lâminas da membrana do retículo endoplasmático.



Uma vez que novas moléculas de lípidos são adicionadas só à metade citosólica da bicamada, e que as moléculas de lípidos não se movem espontaneamente de uma monocamada à outra, o transportador de fosfoglicerídeo ligado à membrana (“misturador”) é necessário para transferir moléculas de lípido da metade citosólica para a metade do lúmen, de modo que a membrana se desenvolva como uma bicamada.

O “misturador” não é específico para grupos cabeça de fosfoglicerídeo em particular e, portanto, equilibra os diferentes fosfoglicerídeos entre as duas monocamadas.

⇒ **Síntese de colesterol e ceramida**

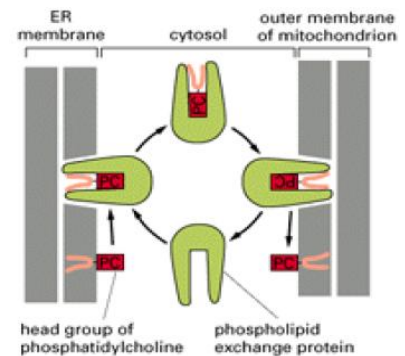
No retículo endoplasmático liso, ocorre também a síntese de colesterol, hormonas esteróides a partir do colesterol e ceramida. A ceramida é constituinte dos esfingolípidos e dá origem à esfingosina quando se liga a um ácido gordo.

⇒ **Transporte de fosfoglicerídeos**

✚ Vesículas – transportar para o complexo de Golgi, lisossomas e membrana plasmática

✚ Proteínas da membrana – existem proteínas no citosol que reconhecem os fosfolípidos, ligam-se a elas e transportam-nos para a membrana do organelo desejado. No caso da mitocôndria, a fosfatidiletanolamina, não vai ser transferida. A fosfatidilserina sofre descarboxilação na membrana da mitocôndria e transforma-se em fosfatidiletanolamina, para depois ser integrada na membrana.

✚ Contacto entre membranas – quando as membranas podem contactar directamente entre si, transportam as moléculas através dos pontos de contacto.



5.7. Destino das proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático

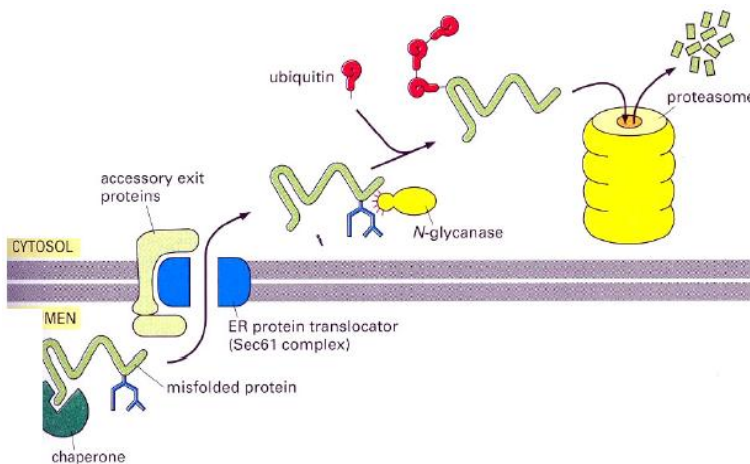
No retículo endoplasmático, ocorre a síntese das proteínas que vão ser transportadas para as várias fracções do complexo de Golgi, e daqui para os lisossomas ou membrana. A partir deste momento, são secretadas de duas formas:

- ✚ Excretadas continuamente por exocitose (secreção constitutiva);
- ✚ Ficam retidas na célula e só se recebem estímulo externo é que são excretadas (secreção regulada).

Quando as proteínas passam para o complexo de Golgi e depois para os lisossomas e para o exterior da célula, significa que as vesículas vão ser diferentes. Por outro lado, existem vesículas do retículo para as organelas e proteínas que atinjam o complexo de Golgi podem voltar ao retículo endoplasmático se tiverem conformação inadequada.

5.8. Ubiquitinação

Quando as proteínas são consideradas anormais, ou ficam no lúmen ou passam para o complexo de Golgi, não conseguindo completar o transporte para o seu destino. Quando isto acontece, devido ao facto de as proteínas provocarem destabilização da célula, têm uma conformação imprópria e são reconhecidas por chaperões, fazendo com que as proteínas passem para o citosol através do translocador que as reconheceu quando entraram para o lúmen do retículo.



Este translocador é uma proteína transmembranar que reconhece a proteína como proteína que deve ir para o lúmen do retículo e permitindo-lhe a passagem para o citosol. Posteriormente, ocorre a remoção da cadeia oligossacarídica através da glicanase, num processo designado **ubiquitinação**.

Neste processo, as ubiquitinas que estão no citosol reconhecem a proteína num determinado aminoácido que tem compatibilidade com a ubiquitina. A proteína que tem a cadeia de ubiquitinas vai ser reconhecida por um **proteossoma** que tem a capacidade de destruir as proteínas e de controlar a qualidade da célula.

O processo de ubiquitinação ocorre no citosol, mas também pode dar-se no núcleo. Quando isto acontece, proteínas que são transportadas para o núcleo podem estar a adquirir uma conformação errada. Assim, tanto podem sofrer uma desfosforilação ou uma fosforilação como podem ser sintetizadas em determinadas alturas por diferentes processos, sendo no final eliminadas.

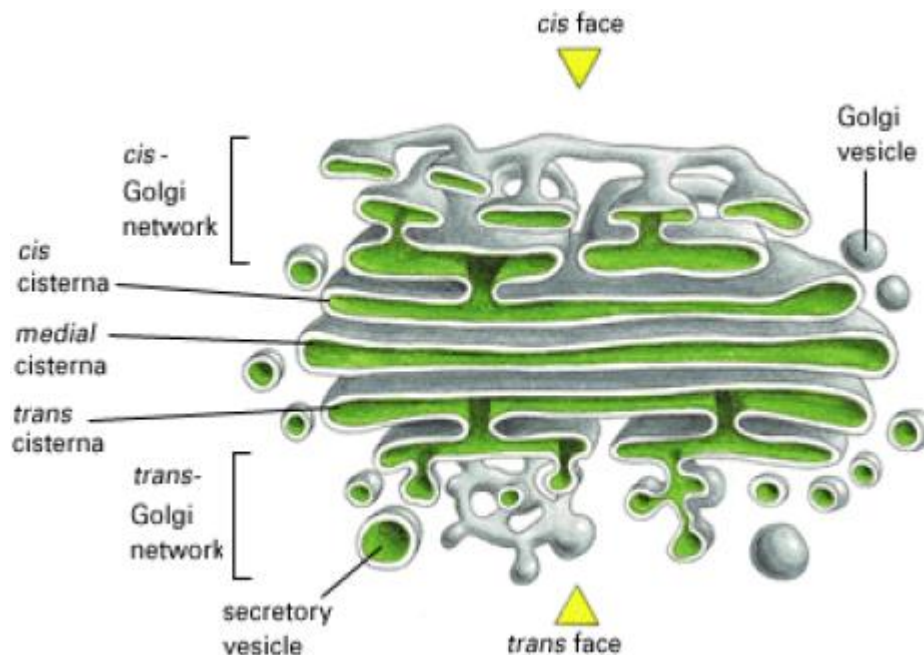
6. Complexo de Golgi

O complexo de Golgi localiza-se, geralmente, perto do núcleo e é constituído por uma série de cisternas empilhadas, rodeadas por inúmeras vesículas. Em cada pilha de cisternas distingue-se uma face *cis* (ou face de entrada), mais próxima do núcleo, uma face *trans* (ou face de saída), mais afastada do núcleo e uma face média situada entre as duas anteriores.

Junto à face *cis*, as vesículas representam um sistema de vaivém entre o Golgi e o retículo endoplasmático rugoso: das cisternas do retículo destacam-se, continuamente, vesículas que se fundem com as cisternas do complexo de Golgi, transportando as proteínas destinadas à via de secreção; em sentido inverso, destacam-se vesículas das cisternas do Golgi que retornam ao retículo transportando proteínas que não entram na via de secreção.

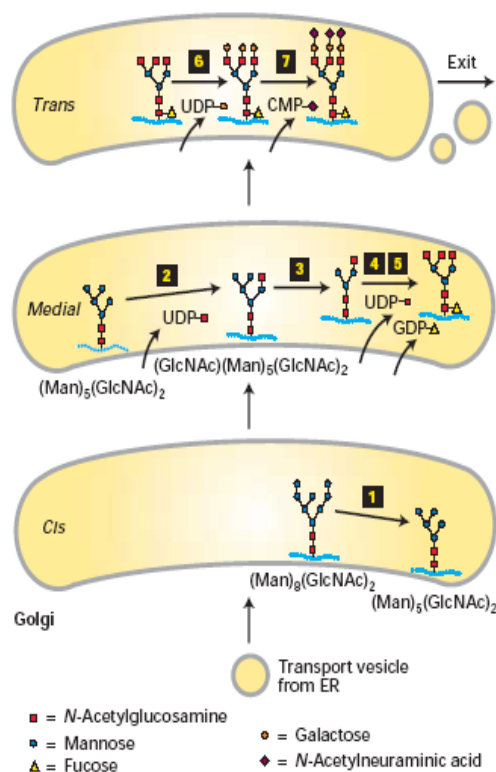
Da face *trans* destacam-se vesículas destinadas ou à via de secreção ou aos lisossomas. Ao atravessar o complexo de Golgi, as proteínas sofrem uma série de modificações que incluem a remoção de alguns açúcares (geralmente resíduos de manose), a adição de outros (por exemplo, N-acetilglucosamina,

galactose e ácido siálico). O complexo de Golgi é, portanto, o local da célula onde se produzem as glicoproteínas e os proteoglicanos.



No complexo de Golgi existe, ainda, o TGN (Trans Golgi Network) que parte as vesículas para as diferentes partes da célula (membrana, lisossomas, exterior da célula, etc.)

6.1. Modificação das glicoproteínas sintetizadas no retículo endoplasmático



As enzimas que catalisam cada um dos passos deste processo encontram-se situadas em compartimentos indicados. Depois da remoção de três resíduos de manose no cis-Golgi (1), a proteína passa por progressão cisternal para o medial-Golgi. Aqui, três resíduos de N-acetilglucosamina são adicionados (2,4), outros dois resíduos de manose são removidos (3) e é adicionado um único resíduo de fucose (5).

O processamento é terminado no trans-Golgi por adição de três resíduos de galactose (6) e finalmente pela ligação de um resíduo de ácido N-acetilneuramínico a cada um dos resíduos de galactose (7). Enzimas específicas de transferência adicionam açúcares ao oligossacarídeo, um a um, dos nucleótidos de açúcar precursores importados do citosol.

Este percurso representa o processamento do complexo de Golgi para uma glicoproteína habitual. Assim, alterações na estrutura de oligossacarídeos do tipo N-ligação podem provocar diferenças nos passos deste processamento do complexo de Golgi.

6.2. Glicosilação do tipo O-ligação

Os oligossacarídeos tipo ligação-O, geralmente ligados a serina ou treonina, apresentam dimensões reduzidas e contêm entre um e quatro resíduos de açúcar. Nesta glicosilação, o primeiro açúcar é a acetilglucosamina, sendo que à medida que a proteína passa uma cisterna para outra, sofre maturação. (Também pode acontecer que a galactose seja o açúcar inicial e se ligue à hidroxilisina.)

Esta glicosilação ocorre no lúmen do complexo de Golgi através da intervenção das glicosiltransferases que adicionam um monossacarídeo (ligado a um nucleótido) de cada vez, à proteína.

6.3. Compartimentalização do complexo de Golgi (marcação de enzimas)

O estudo da actividade enzimática dos elementos do complexo de Golgi não se tem limitado às observações *in situ* mas também às suas subfracções obtidas por métodos de centrifugação diferencial e electroforese de fluxo livre. Foi a partir da detecção de certas enzimas que muito se avançou no esclarecimento de algumas funções do complexo de Golgi. Entre as enzimas marcadores do complexo de Golgi, existem as seguintes:

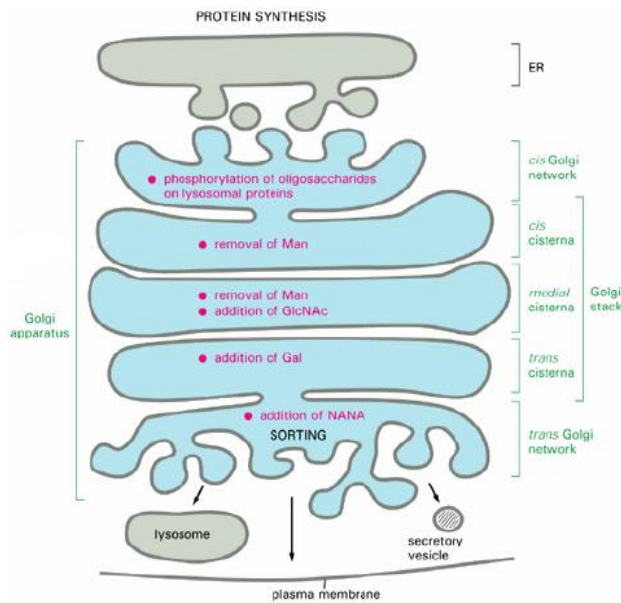
- ✚ TPPase – localiza-se no trans-Golgi
- ✚ CMPase – localiza-se no trans-Golgi
- ✚ NDPase – localiza-se no trans-Golgi
- ✚ NADPase – localiza-se no medial-Golgi
- ✚ AcPase – localiza-se no trans-Golgi
- ✚ AMPase – tem uma distribuição compartimentada que se traduz pela localização da enzima.

A primeira demonstração da heterogeneidade das cisternas do complexo de Golgi residuiu nos resultados citoquímicos que demonstravam já diferenças qualitativas. Estas diferenças, especialmente bem documentadas no hepatócito *in situ* e nas fracções isoladas, serviram como marcadores para o estudo da forma e disposição do complexo de Golgi em muitas outras células.

Assim, os achados citoquímicos permitiram admitir a especialização dos componentes do Golgi e a sua diferenciação em *cis* e *trans*. A glicosilação das proteínas é o modelo melhor conseguido na demonstração da compartimentação do complexo de Golgi, sendo a glicosilação a principal modificação química das proteínas que passam pelo complexo de Golgi.

6.4. Processamento da cadeia oligossacarídica das glicoproteínas

A estrutura precursora de todos os oligossacarídeos ligação-N, nas plantas e nos animais, é um oligossacarídeo ramificado que contém 2 moléculas de N-acetilglucosamina, 9 manoses e 3 glicoses. Este oligossacarídeo está ligado por um resíduo pirofosforil a um lípido não saturado, fortemente hidrofóbico – o dolicol – que está incluído na membrana do retículo endoplasmático.



O processo de síntese é complexo, uma vez que os glucídios são adicionados um a um, inicialmente na superfície citosólica do retículo e mais tarde na sua própria luz onde se concluirá a síntese do sacarídeo. Este é depois transferido para os resíduos asparagina dum polipéptido em formação, por intermédio da oligossacarídeo transferase. No retículo endoplásmico, imediatamente após a actuação desta enzima, as 3 glicoses (que actuam como sinal de finalização ou maturação do oligossacarídeo) e 1 manose são removidas. Do retículo endoplásmico, esta glicoproteína passa ao complexo de Golgi por meio de vesículas (COP II) e aqui é processada, pela intervenção dum conjunto de reacções coordenadas, que consistem na remoção de

cinco das 8 manoses restantes, na adição de 3 N-acetilglucosaminas, 3 galactoses, 3 resíduos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) e uma fucose, uma reacção de cada vez, em relação a cada cadeia do oligossacarídeo.

6.5. Síntese de proteoglicanos

Os **glicosaminoglicanos** são polissacarídeos complexos, geralmente de cadeia linear e elevado peso molecular, existentes na matriz extracelular e à superfície das células. Podem ainda ocorrer intracelularmente e, em situações patológicas, ser aí acumulados.

O ácido hialurónico é talvez o único glicosaminoglicano que, nos sistemas biológicos, não se encontra associado a proteínas por ligações covalentes. Todos os outros se apresentam, geralmente, ligados a um componente proteico, associação esta que origina macromoléculas designadas **proteoglicanos**.

Os proteoglicanos podem, então, diferir devido às características da sua porção proteica e/ou ao tipo, número e particularidades dos glicosaminoglicanos e oligossacarídeos que possuem. É hoje reconhecido que o número de diferentes proteoglicanos passível de ser sintetizado e secretado por um único tipo celular é bastante considerável. A síntese das porções proteicas segue o esquema clássico das proteínas para exportação, precedendo o início da síntese das cadeias de glicosaminoglicanos. O ácido hialurónico, por sua vez, é sintetizado por uma enzima localizada na membrana celular, sendo directamente libertado para o espaço extracelular. Para além disso, este ácido é uma molécula polianiónica, mantendo uma conformação expandida nos tecidos por repulsão electrostática e retenção de uma grande quantidade de moléculas de água.

6.6. Síntese de esfingolípidos e de esfingomielina

Os glicolípidos e a esfingomielina são derivados da ceramida (esfingosina + ácidos gordos) e são importantes na constituição da membrana. A ceramida vai ser sintetizada no retículo endoplasmático e ao ser transportada para o complexo de Golgi pode seguir duas vias:

- ✚ Sofre uma glicosilação e transforma-se num glicolípido;
- ✚ Sofre uma adição de uma fosfocolina, transformando-se numa esfingomielina.

Quanto ao complexo de Golgi, este para além de ser responsável por direccionar o destino das diferentes moléculas, vai permitir a modificação de proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático, modificando a cadeia oligossacarídica, induzindo a glicosilação que vai permitir a formação dos proteoglicanos, ou induzindo a formação de um glicolípido (ou esfingolípido), consoante a situação.

6.7. Tipos de vesículas de transporte

✚ **Vesículas revestidas por clatrina** – participam na endocitose e no transporte de moléculas do complexo de Golgi para endossomas tardios ou lisossomas.

✚ **COP I** – apresentam um revestimento diferente e têm a capacidade de transportar as proteínas da zona trans para a zona cis, ou da zona cis para o retículo endoplasmático.

✚ **COP II** – transportam as proteínas entre as cisternas do complexo de Golgi e o retículo endoplasmático.

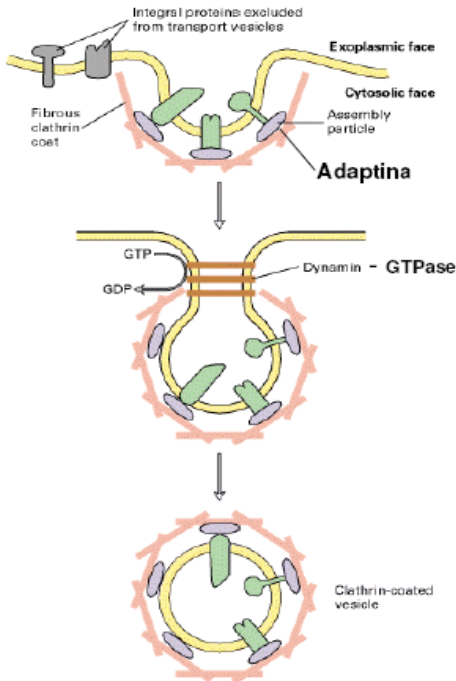
6.8. Formação de vesículas

No processo de formação de vesículas, estão sempre envolvidas GTPases que são activas quando ligadas ao GTP e inactivas quando ligadas ao GDP, pois caso estivessem sempre activas o processo seria contínuo.

⇒ Formação das vesículas revestidas por clatrina

Estas vesículas formam-se em zonas da membrana designadas **coated pits** que são porções de membranas que existem no complexo de Golgi e na membrana plasmática. Assim, podem formar-se no complexo de Golgi para levar as proteínas para os lisossomas ou na membrana plasmática para permitir processos de endocitose.

As membranas têm de possuir receptores para as moléculas que têm sinais para serem transportadas para endossomas e, no lado de invaginação, devem existir moléculas adaptadoras que vão ser reconhecidas pela clatrina e que se designam por **adaptinas**. (Este processo de associação não consome energia.)



Para haver fusão da membrana da vesícula, há necessidade da intervenção de uma GTPase, a **dinamina**, que actua formando e terminando a vesícula.

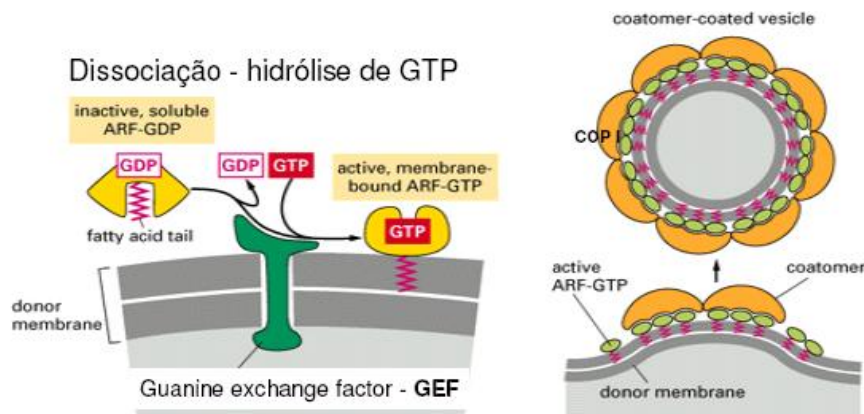
A clatrina apenas é necessária para a formação da vesícula, sendo dissociada no final do processo, com a ajuda de chaperões, hidrólise do ATP e, provavelmente, pelo controlo da concentração de cálcio. Assim sendo, só no final da dissociação é que a vesícula é reconhecida pelos lisossomas e se funde com as suas membranas.

⇒ Formação das vesículas COP I e COP II

Para que haja formação de vesículas, é necessário que haja a intervenção de proteínas que se inserem na membrana, sendo elas as GTPases: para a COP I é a ARF e para a COP II a Sar1.

Estas proteínas existem no citosol na forma inactiva e ligadas ao GDP. Têm incorporadas moléculas lipídicas e enquanto permanecerem inactivas, as moléculas lipídicas ficam protegidas do meio aquoso (citossol).

Quando a GTPase se torna activa, necessita da proteína GEF (que permite a transformação de GDP em GTP). Assim, o GEF faz esta transformação, sendo que o GTP ao reagir com a GTPase vai permitir que o ácido gordo altere a sua conformação, ficando inserido na membrana. Esta molécula lipídica vai ser reconhecida pelo revestimento (COP I ou COP II) e este vai ligar-se à GTPase.



Para ocorrer a dissociação do revestimento, o GTP tem de ser hidrolisado. Com isto, altera-se a conformação e o ácido gordo vi ser recolhido na molécula, havendo um local de ligação para o entre o revestimento e a proteína.

6.9. Fusão de membranas

A membrana da vesícula tem que ter sinais que vão ser reconhecidos pela membrana-alvo. Através de estudos sobre vírus, tornou-se facilitado o estudo sobre a fusão das membranas, na medida em que o vírus que se encontra numa célula, permite que haja a fusão das duas membranas e que o seu conteúdo se liberte no interior da vesícula resultante.

No processo de fusão de membranas existem:

Proteínas fusogénicas (SNAREs):

- ✚ v-SNARE – existe nas membranas onde se formam as vesículas;
- ✚ t-SNARE – existe nas membranas das organelas alvo onde se fundem as membranas.

Proteínas que controlam a especificidade (Rab):

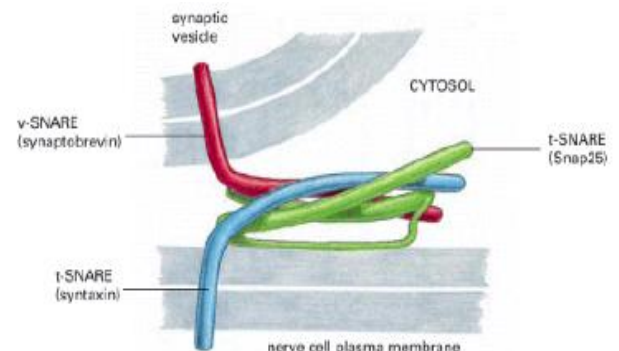
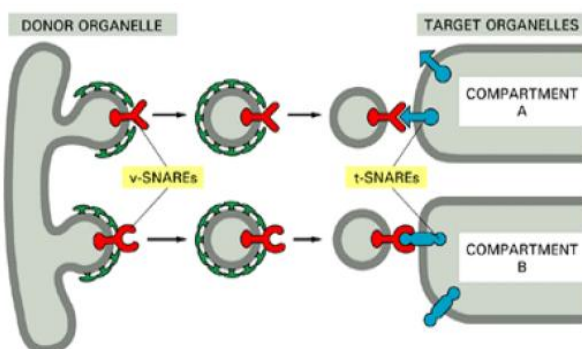
- ✚ Rab – GTPase que controla a especificidade da ligação v-SNARE/t-SNARE e que na sua forma citosólica, fica inactiva e designa-se Rab-GDP.

Proteínas que permitem a dissociação (NSF):

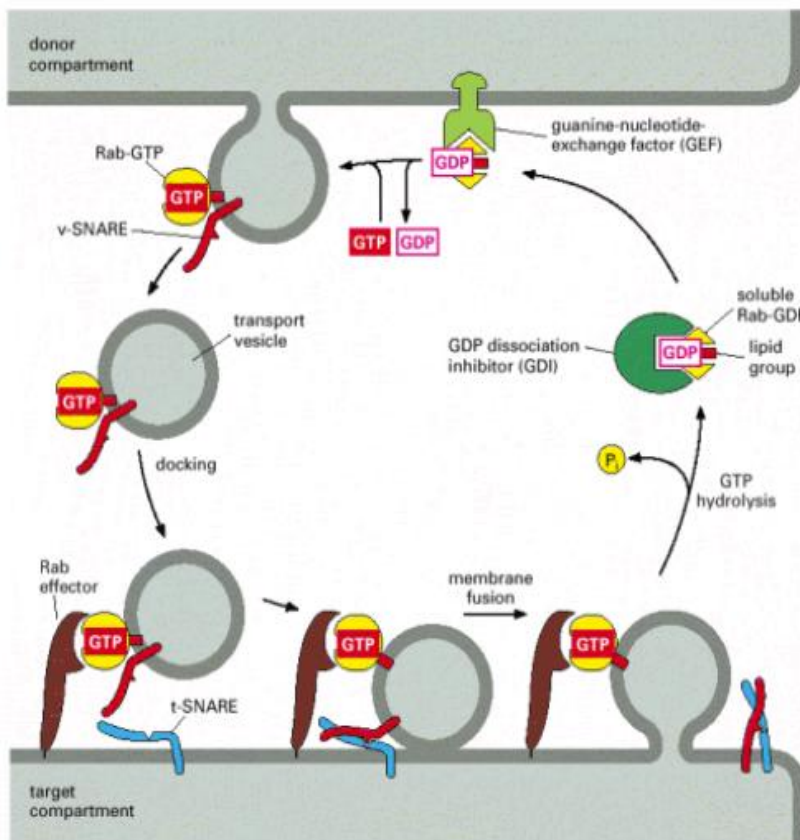
- ✚ NSF – permite a dissociação das SNAREs após a fusão das membranas (hidrólise do ATP).
- ✚ SNAPs – permitem a ligação do NSF à vesícula.
- ✚

⇒ Intervenção dos SNAREs

As proteínas na membrana interna de uma dada vesícula possuem v-SNAREs, cruciais para uma eventual fusão da vesícula com uma membrana-alvo apropriada. Pouco depois de a vesícula estar formada, o revestimento expõe as suas v-SNAREs. O local específico de ligação das v-SNAREs na membrana da vesícula encaminha-se para os organelos-alvo que possuem membranas onde se encontram as tSNAREs. Com a aproximação das duas membranas, as duas bicamadas fundem-se e formam-se um complexo SNARE.



⇒ Intervenção da Rab e do respectivo effector

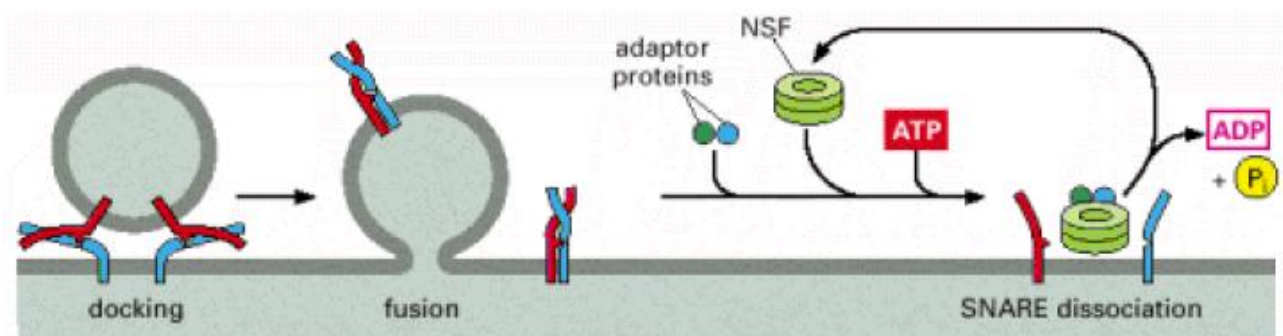


O Rab é uma GTPase que está inactiva no citosol porque está ligada a um GDP e outras moléculas que impedem a activação. Quando fica activa devido à presença de GTP (Rab-GTP) já se pode ligar a uma vesícula do organismo dador que tem v-SNAREs.

Esta vesícula aproxima-se da membrana-alvo apropriada, onde existem efectores Rab e t-SNAREs. Assim, os efectores reconhecem o Rab-GTP e os t-SNAREs reconhecem os v-SNAREs, formando-se um complexo com cada. De seguida, ocorre a fusão das membranas e a libertação do complexo SNARE para uma nova fusão vesicular.

⇒ Intervenção do NSF e das SNAPs

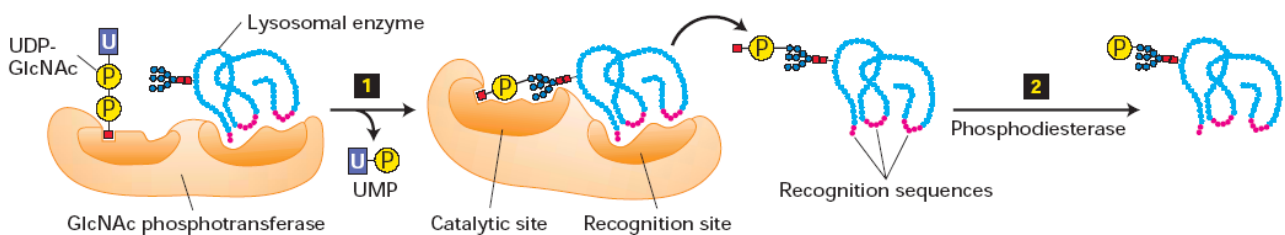
Depois de ocorrer a fusão das duas membranas, ocorre imediatamente a dissociação das proteínas SNARE que constituem o seu complexo. Para isto ocorrer, intervém a NSF juntamente com uma proteína SNAP que se liga ao complexo. A NSF catalisa a hidrólise do ATP em ADP + Pi conduzindo à dissociação das duas proteínas para uma nova fusão membranar.



6.10. Processamento das proteínas transportadas para endossomas tardios

Os resíduos de M6P (manose 6-fosfato) que direccionam as proteínas para os lisossomas são sintetizados no cis-Golgi por duas enzimas do complexo de Golgi.

- (1) – Uma fosfotransferase da GlcNAc (N-acetilglucosamina) transfere uma molécula de GlcNAc fosforilada para o carbono-6' de um ou mais resíduos de manose. Devido à exclusividade de as enzimas dos lisossomas conterem sequências que são reconhecidas e ligadas a esta enzima, os grupos de GlcNAc fosforilados são adicionados especificamente às enzimas dos lisossomas.
- (2) – Depois da libertação proteína modificada da fosfotransferase, uma fosfodiesterase remove o grupo GlcNAc, deixando na enzima do lisossoma um resíduo fosforilado de manose.

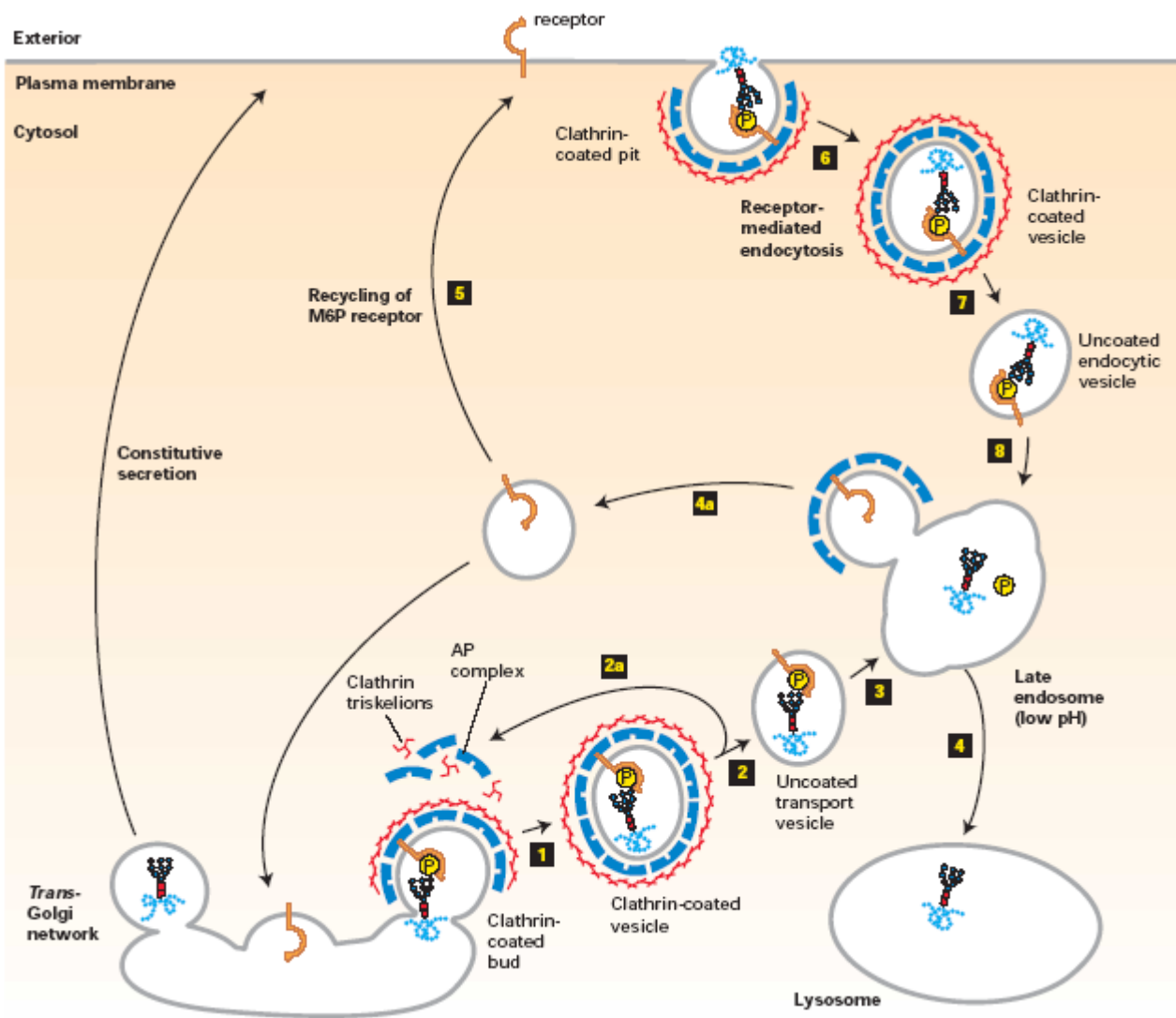


6.11. Transporte das proteínas para endossomas

A secreção das enzimas lisossomais M6P das proteínas membranares e sintetizadas ocorre no TGN. Aqui, os receptores transmembranares para a M6P ligam cuidadosamente os resíduos de M6P às proteínas-destino dos lisossomas, tendo em conta a sua especificidade.

As vesículas de clatrina que contêm os receptores M6P e as enzimas lisossomais separam-se do TGN, perdem o seu revestimento e subsequentemente fundem-se com os endossomas tardios. Tendo por base que os receptores do M6P podem ligar a M6P no pH ligeiramente ácido (6,5) do TGN mas nunca num pH inferior a 6, as enzimas lisossomais são libertadas dos endossomas tardios, que apresentam pH próximo de 5.

Além disso, a fosfatase que se localiza no interior destes endossomas remove geralmente o fosfato dos resíduos de M6P das enzimas lisossomais, prevenindo quaisquer novas ligações do receptor de M6P que pudessem ocorrer devido ao pH ácido dos endossomas. As vesículas que se vão separando dos endossomas tardios reciclam o receptor M6P de novo ao TGN ou, em casos particulares, à superfície da célula. Eventualmente, os endossomas tardios fundem-se com lisossomas, entregando as enzimas lisossomais ao seu destino final.



6.12. Deslocação das vesículas no interior da célula

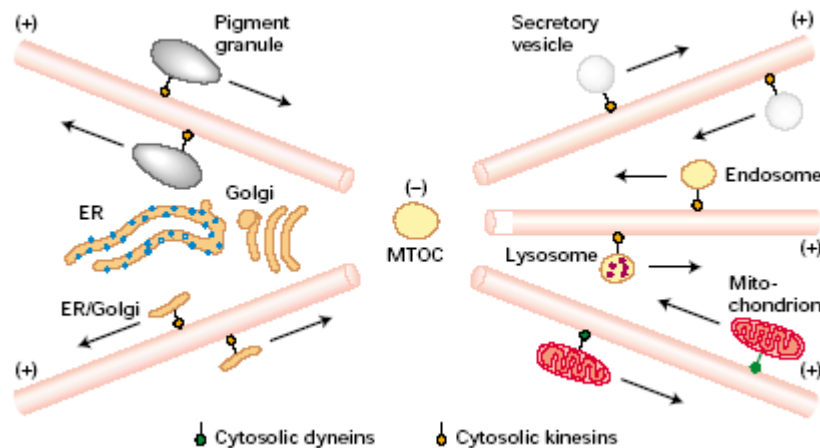
Devido à orientação dos microtúbulos fixada pelo MTOC, a direcção do transporte (para o interior para o exterior da periferia da célula) depende da proteína motora utilizada. Algumas cargas como grânulos de pigmento, podem alternar a direcção do movimento no interior de um único microtúbulo.

Neste caso, tanto o movimento de avanço como o de retrocesso das proteínas motoras dos microtúbulos têm de estar associados à mesma carga. Estudos recentes identificaram a dinactina num complexo com cinesina.

Um modelo propõe que a dinactina seja parte do receptor da membrana e funcione como adaptador comum para a cinesina de ligação e para a dineína citoplasmática. Consequentemente, a direcção do movimento pode ser alterada pela troca da proteína motora actual por outra.

Todos os microtúbulos com a sua extremidade (+) virada para a periferia da célula, irradiam de um MTOC na região do complexo de Golgi. O transporte de avanço dependente das cinesinas conduz as

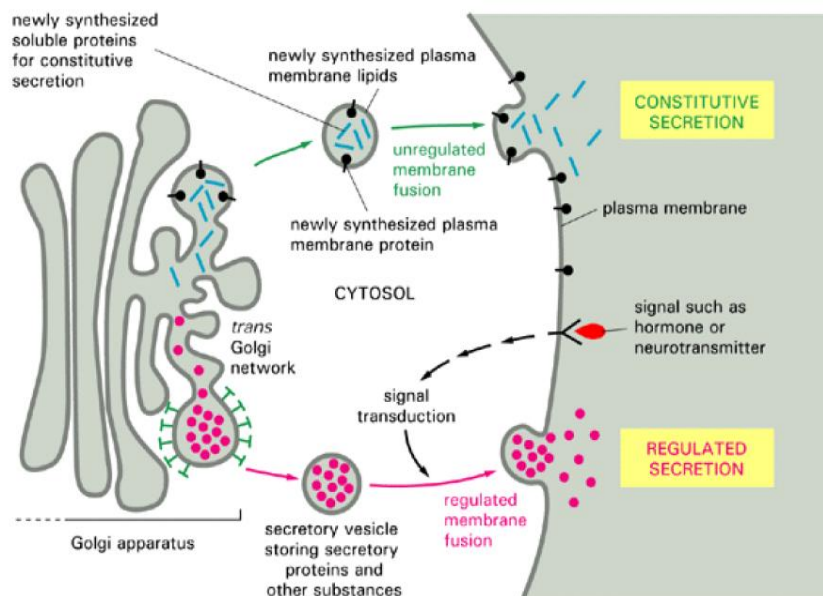
mitocôndrias, os lisossomas e um sortido de vesículas para o retículo endoplasmático ou para a periferia da célula. Por sua vez, o transporte retrógrado depende das dineínas transporta mitocôndrias, elementos do retículo endoplasmático e endossomas tardios para o centro da célula.



6.13. Tipos de secreção

Secreção constitutiva – intervêm moléculas que estão a ser sintetizadas e a serem excretadas continuamente da célula. Existe ainda um conjunto de vesículas que se formam, as vesículas secretoras, onde se acumulam moléculas e que permanecem na célula até que o organismo necessite delas.

Secreção regulada – necessita de um estímulo do exterior, podendo ser um neurotransmissor ou uma hormona, que se liga a um receptor da membrana e faz com que as moléculas existentes sejam secretadas da célula.



7. Lisossomas

Os lisossomas são “sacos” intracelulares delimitados por uma membrana e cheios de enzimas hidrolíticas, capazes de digerir todas as macromoléculas da célula. Conhecem-se cerca de 40 tipos de enzimas lisossômicas, que incluem proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases. Todas estas enzimas têm uma particularidade: são preferencialmente activas em meio ácido e, para acidificar o seu meio interno, os lisossomas possuem na membrana uma bomba de prótons.

Deste modo, a célula está duplamente protegida contra um “ataque” por parte das enzimas lisossômicas. Por um lado, a membrana impede o acesso das enzimas ao citoplasma. Por outro, no caso de eventual fuga, as enzimas não são activas ao pH neutro do citoplasma.

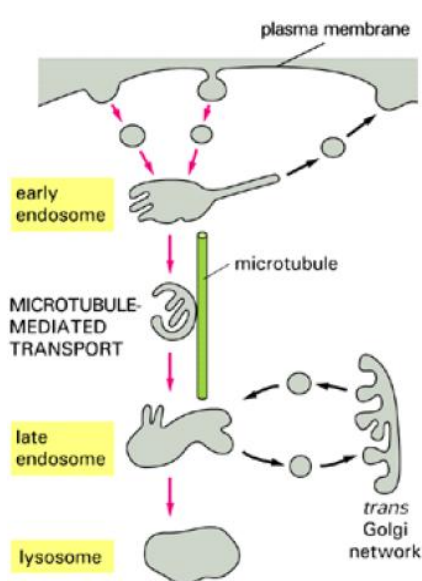
Os lisossomas têm bombas de hidrogénio tipo V que permitem bombear H^+ do citosol para os lisossomas e o consequente abaixamento do pH.

Na célula, os lisossomas desempenham fundamentalmente três funções:

- ✚ Digerem macromoléculas provenientes do exterior pela via da endocitose, fornecendo nutrientes para o metabolismo da célula.
- ✚ Desempenham um papel fundamental na destruição de componentes celulares obsoletos – autofagia.
- ✚ Participam na degradação de microrganismos ou partículas nocivas à célula através do mecanismo de fagocitose.

7.1. Formação dos lisossomas

Existem três tipos de vesículas:



- ✚ Endossomas periféricos – não possuem enzimas hidrolíticas e só são transformados pelos endossomas tardios.
- ✚ Endossomas tardios – recebem as enzimas hidrolíticas do complexo de Golgi.
- ✚ Lisossomas

Os endossomas periféricos transformam-se em lisossomas através de um destes dois processos:

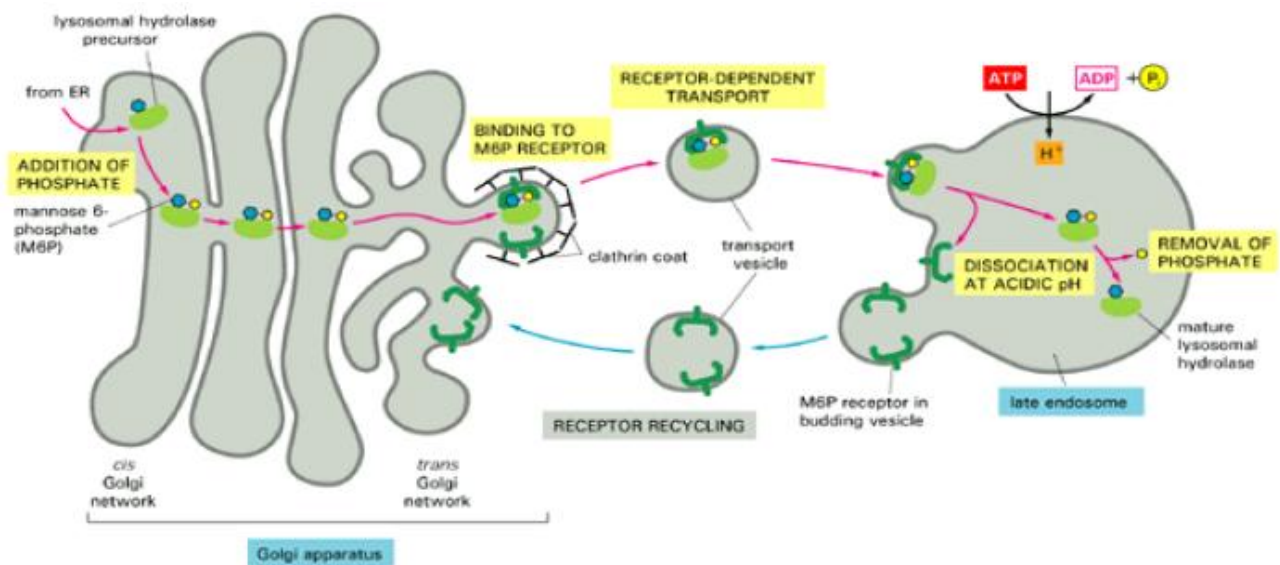
- ✚ As vesículas sofrem maturação e portanto vão-se transformando progressivamente em lisossomas.
- ✚ Existem três vesículas que comunicam entre si e transportam as moléculas entre si por um sistema de vesículas que vão transportando o conteúdo do endossoma para o endossoma tardio e depois para o lisossoma.

7.2. Transporte das enzimas hidrolíticas do complexo de Golgi para os lisossomas

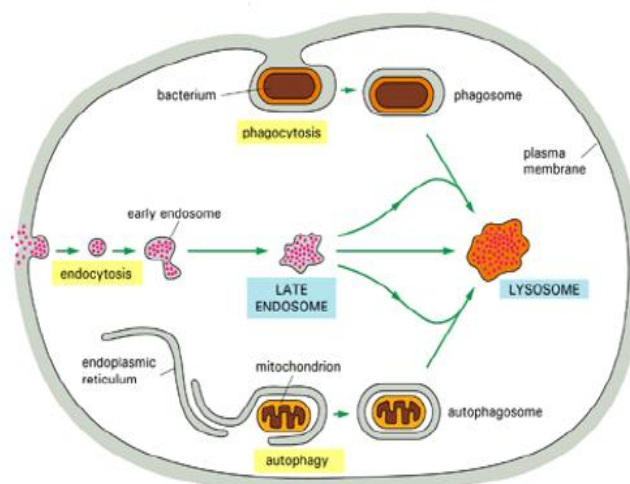
As enzimas hidrolíticas são sintetizadas no retículo endoplasmático e que se sofrem transformação de fosforilação da manose na posição 6 no complexo de Golgi. Isto é um sinal que vai ser reconhecido pelo receptor do M6P que se encontra no TGN e que permite a ligação das moléculas fosforiladas.

Depois desta ligação, a vesícula perde o revestimento de clatrina e dissocia-se formando uma vesícula de transporte. Esta vesícula vai de encontro ao endossoma tardio, com o qual funde a membrana, libertando o seu conteúdo para o interior do endossoma. Neste endossoma, ocorre a hidrólise do ATP, enviando uma molécula de H^+ para o seu interior e diminuindo o pH. Com isto, o M6P dissocia-se do receptor, para de seguida lhe ser removido o grupo fosfato e originar a enzima hidrolítica.

Por fim, os receptores de M6P aderem à membrana do endossoma e aqui são recicladas para uma nova utilização.



7.3. Proveniência dos materiais que chegam aos endossomas



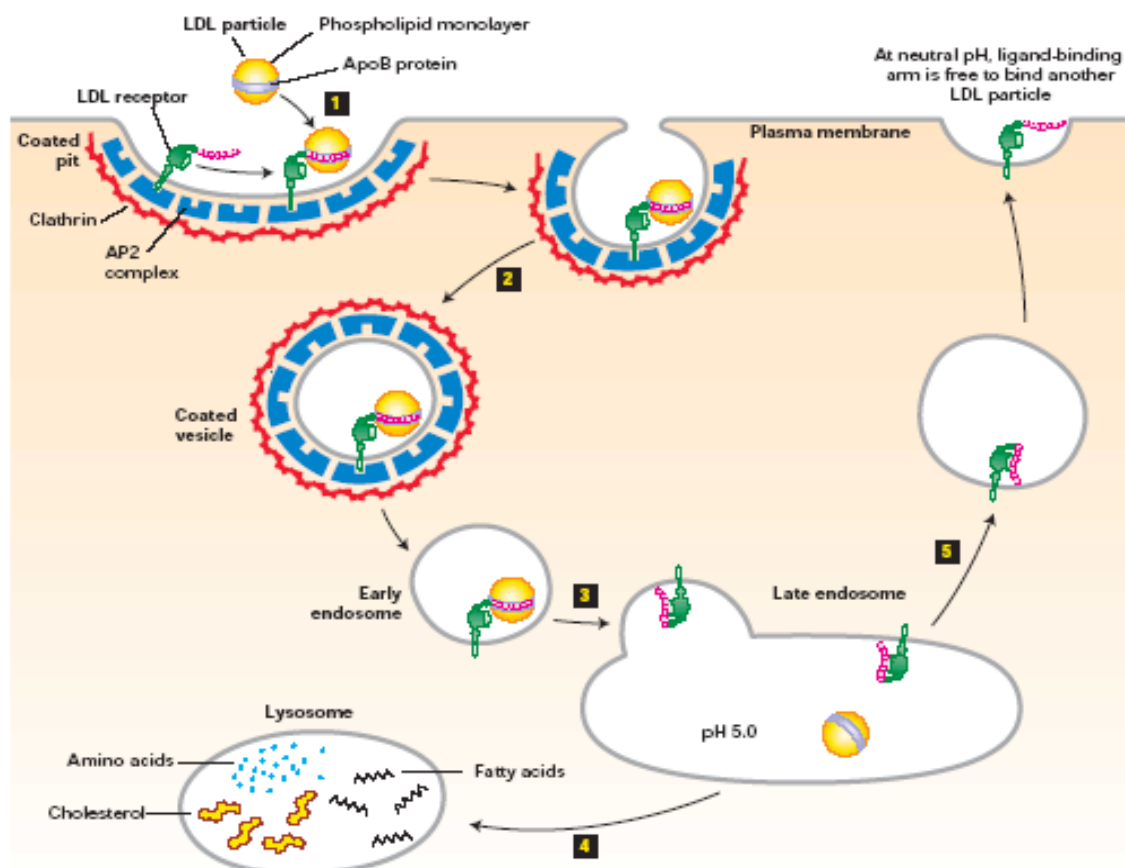
⇒ Endocitose / Pinocitose

Na pinocitose ocorre a formação de vesículas revestidas por clatrina nos coated pits. Uma partícula de **LDL** (low-density lipoprotein) é uma esfera com aproximadamente 25 nm de diâmetro, apresenta um fosfolípido externo que contém uma única molécula de uma proteína designada **apoB-100**.

A maior parte das células produz receptores para a superfície da célula, que se ligam especificamente à proteína apoB-100 e englobam a LDL através da endocitose mediada por esses receptores. Depois da endocitose, as partículas de LDL são transportadas para os lisossomas através de um percurso endocítico e depois são degradadas por hidrolases lisossômicas. Os receptores de LDL, que se dissociam dos seus ligandos no endossoma tardio, vão ser reciclados para a membrana celular.

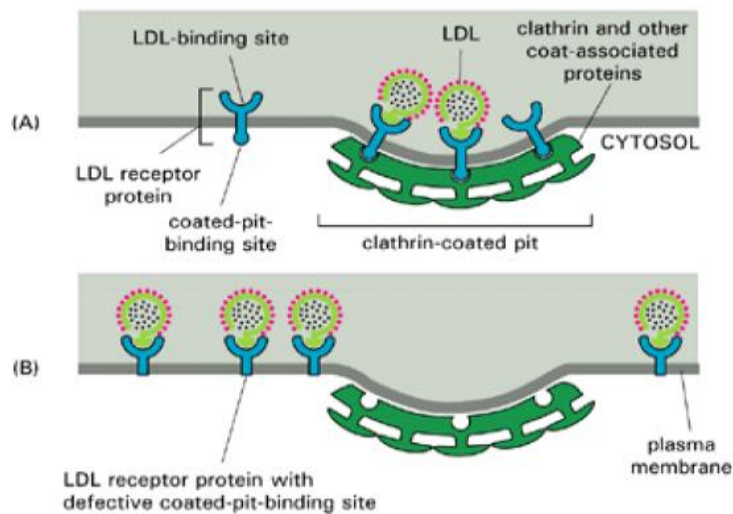
Tendo por base que o endossoma tardio tem $\text{pH} = 5.0$ no seu interior, vai então fundir-se com o lisossoma e as proteínas e lípidos da partícula livre de LDL são distribuídas para as suas partes constituintes, por enzimas no lisossoma, formando uma vesícula que contém ácidos gordos, aminoácidos e colesterol.

Por fim, o material não digerido nos lisossomas é eliminado por exocitose e formam-se cavéolas em que não há formação de vesículas revestidas, mas sim a formação de cavéolas em rafts lipídicos através da caveolina.



Nota: Nos receptores dos coated-pits, podem surgir dois casos distintos :

- (A) O receptor de LDL está localizado na membrana plasmática apresenta um local de ligação para o LDL e um terminal na parte inferior que permite o emparelhamento com o coated-pit revestido por clatrina. Depois de ocorrer esta ligação, os LDL vão ligar-se aos receptores que se encontram no coated-pit.
- (B) O receptor de LDL é diferente do anterior porque não apresenta o terminal de ligação para o coated-pit revestido por clatrina. Assim, as partículas de LDL ligam-se aos receptores que permanecem nos locais originais da membrana e o coated-pit fica vazio.

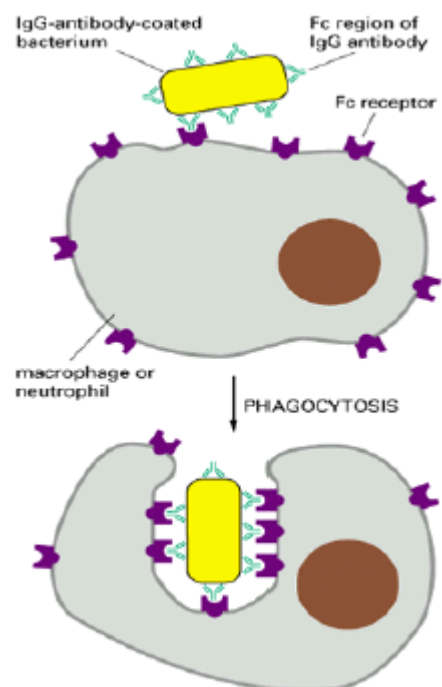


⇒ Fagocitose

A fagocitose é uma forma especial da endocitose onde partículas de grandes dimensões, como microrganismos, são ingeridos através de grandes vesículas fagocíticas, os fagossomas.

Existem dois tipos de células que realizam a fagocitose: os macrófagos e os neutrófilos. Estes dois tipos de células desenvolvem-se a partir de uma mesma célula precursora e defendem o nosso organismo contra infecções provocadas pela ingestão de microrganismos. Para além disso, os macrófagos também são importantes no processo de eliminação de células velhas ou danificadas.

Enquanto que as vesículas endocíticas envolvidas no processo de pinocitose são pequenas e uniformes, os fagossomas apresentam diâmetros determinados pelo tamanho da partícula ingerida. Os fagossomas fundem-se com lisossomas e o material ingerido é degradado. De seguida, substâncias indigestíveis permanecem nos lisossomas, formando corpos residuais.



Para serem fagocitadas, as partículas têm de ligar-se inicialmente à superfície do fagócito. Estes têm uma grande variedade de receptores na sua superfície, que estão funcionalmente ligados à maquinaria fagocítica da célula. Ao contrário da pinocitose, a fagocitose é um processo com iniciadores que requer os receptores activados a transmitir sinais para o interior da célula para iniciar a resposta.

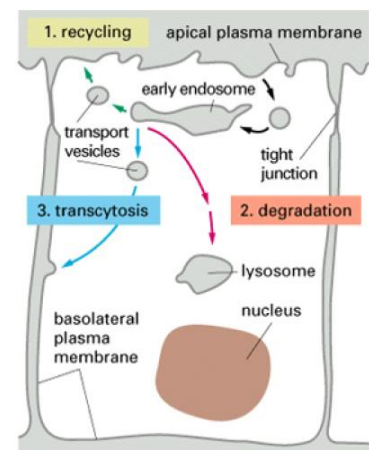
Os melhores iniciadores são anticorpos que se ligam à superfície dos microrganismos infecciosos para formar um revestimento onde a cauda de cada anticorpo (região Fc) se encontra virada para o exterior. O revestimento por anticorpos é reconhecido por receptores específicos (receptores Fc) na superfície dos macrófagos e dos neutrófilos. A ligação destes anticorpos aos receptores induz, então, a emissão de pseudópodes pela célula fagocítica, que englobam a partícula e se fundem para formar o fagossoma.

⇒ Autofagia

A autofagia consiste na digestão intracelular de organelos e estruturas da própria célula. Deste modo, podem ser eliminados organelos que deixaram de ser necessários à actividade celular. Este processo é relativamente selectivo, sendo incluídos nos vacúolos de autofagia, principalmente, os organelos que deixaram de ser funcionais. Contudo, em certos casos, a autofagia pode ser muito mais generalizada.

7.4. Destino dos diferentes tipos de receptores

- ✚ Degradados conjuntamente com a molécula dos lisossomas
- ✚ Transportadas de uma zona da membrana para outra
- ✚ Regressam à membrana para serem reutilizados.



8. Mitocôndrias

8.1. Composição das mitocôndrias

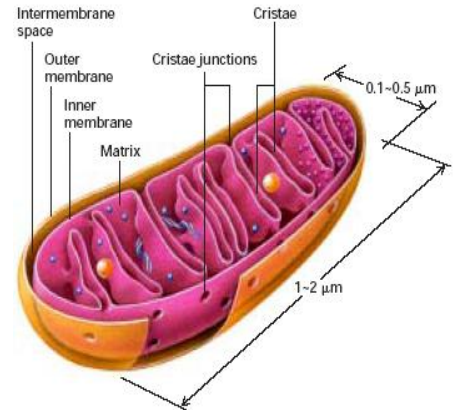
Mitocôndrias são organelos celulares presentes na maioria das células eucarióticas e responsáveis, em condições aeróbias, pela obtenção da maior parte da energia necessária às células que as possuem. Têm aspecto morfológico muito variável, podendo ocorrer, contrariamente ao que o seu nome indica, sob diversas formas, como redonda, oval e em bastonete ou filamento, e apresentando variações no seu tamanho, número e distribuição, não só segundo os diferentes tipos de células como também durante o ciclo de vida de uma mesma célula.

Uma célula humana contém, em média, cerca de 3000 a 5000 destes organelos citoplasmáticos.

As mitocôndrias contêm duas membranas muito diferentes, que definem dois compartimentos: o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial.

✚ **Membrana externa** – contém proteínas canais que permitem a passagem das substâncias entre o citosol e o espaço intermembranar. Tem também enzimas envolvidas na síntese de lípidos que só existem ao nível da mitocôndria.

✚ **Membrana interna** – forma invaginações designadas por cristas mitocondriais, cujo número varia com o tipo de célula, ou seja, podem ter mais ou menos cristas consoante o nível de energia que a célula consome. Contém cardiolipinas (duplo fosfolípido) que é muito importante pois reduz a permeabilização da membrana a iões. Assim sendo, a membrana interna contém todas as proteínas que intervêm na transferência de electrões, onde se dá a fosforilação oxidativa, ou seja, todas as proteínas que são transportadoras de electrões. Estas proteínas são constituídas por várias cadeias polipeptídicas e formam grandes complexos enzimáticos. Por fim, esta membrana contém a ATP sintetase (que é uma ATPase) que permite a síntese de ATP e que é constituída por várias cadeia polipeptídicas que também têm a capacidade de hidrolisar o ATP.



✚ **Espaço intermembranar** – espaço delimitado pelas duas membranas, apresentando composição semelhante à do citosol.

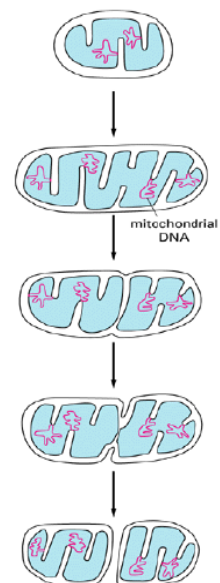
✚ **Matriz mitocondrial** – local onde ocorre grande parte dos processos energéticos da mitocôndria. Apesar de também ser um dos compartimentos da mitocôndria, apresenta composição diferente do espaço intermembranar. Para além disso, é um local muito especializado e contém uma substância fundamental onde coexistem DNA e ribossomas.

8.2. Divisão das mitocôndrias

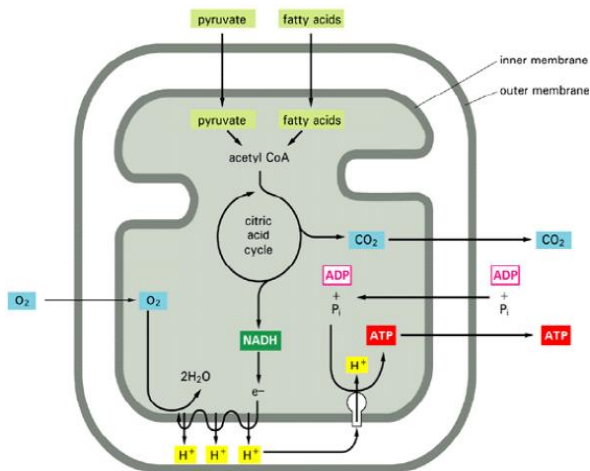
A informação genética que vai ser decodificada, que vai dar origem à síntese das enzimas, existe no núcleo. No entanto, se são enzimas necessárias à sobrevivência da mitocôndria e se vão dar origem à replicação da molécula de DNA mitocondrial, existe no núcleo devido à evolução em que houve transferência de material genético entre a mitocôndria e o núcleo.

Assim sendo, inicialmente os seres procariontes tinham a sua própria informação genética para que houvesse todo este conjunto de mecanismos. A partir do momento em que foram englobados nas células eucarióticas durante a evolução, muito material genético existe na mitocôndria foi transferido para o núcleo celular.

Com este processo de transferência de informação genética, descobriu-se que as mitocôndrias que iam desaparecendo durante a evolução celular, sofriam este fenómeno devido a processos de fusão e divisão própria, observados unicamente em microscopia electrónica.



8.3. Metabolismo aeróbio



A principal fonte de energia celular em células não fotossintéticas é a glicose. A sua degradação completa em dióxido de carbono e água está ligada à síntese de cerca de 32 ATP. Os primeiros estádios, em células eucarióticas, ocorrem no citosol levado à síntese de 2 ATP. Os estádios terminais ocorrem na mitocôndria, podendo levar à produção de cerca de 30 ATP, embora a energia possa também ser utilizada para produção de calor e transporte de moléculas. De qualquer das formas, a mitocôndria pode ser considerada como a bateria da célula.

As células utilizam ATP como fonte de energia imediata para a realização de vários processos químicos, mecânicos e osmóticos. Em organismos aeróbios, o piruvato é completamente oxidado até dióxido de carbono e água. Em células eucarióticas, este processo ocorre nas mitocôndrias e é muito importante na medida em que, como referido, proporciona a síntese de muito mais ATP do que o formado durante a glicólise.

Assim, o metabolismo aeróbio na mitocôndria começa com a produção de acetil-CoA a partir de piruvato, pelo complexo piruvato-desidrogenase. No entanto, a acetil-CoA pode também ser originada a partir da oxidação de ácidos gordos, por enzimas da matriz mitocondrial, e a partir de aminoácidos, representando assim um intermediário central no metabolismo oxidativo da mitocôndria. As principais fontes da acetil-CoA são o piruvato e ácidos gordos, que são selectivamente transportados do citosol, pois a degradação de aminoácidos ocorre principalmente no citoplasma.

⇒ Ciclo de Krebs

No ciclo de Krebs, a acetil-CoA é posteriormente metabolizada numa série de reacções sequenciais, catalisadas por enzimas, conhecidas como o ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Daqui resultam 3 moléculas de NADH, 1 de FADH₂, 1 de GTP e 2 de CO₂. Além destas, formam-se ainda mais duas moléculas que são muito importantes no metabolismo dos aminoácidos. São elas o oxaloacetato e o alfaetoglutarato que actuam como compostos intermediários, da síntese dos aminoácidos, para além de fazerem parte do próprio ciclo.

⇒ Fosforilação oxidativa

O NAD⁺ capta electrões e transforma-se em NADH e capta protões e portanto tem a capacidade de se transformar em NADH. O mesmo acontece com o FAD.

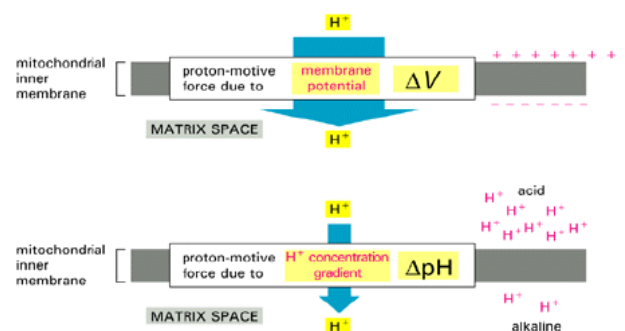
Ao haver a transferência de electrões ao longo da membrana, eles tornam-se cada vez menos energéticos. Existe também uma enzima na membrana interna, a ATP sintetase, que permite que os

prótons existentes em grande quantidade no espaço intermembranar, consigam passar a favor do seu gradiente para a matriz mitocondrial e quando isso acontece, o ADP transforma-se em ATP. Para além disso, também hidrolisa ATP consoante as condições da mitocôndria, como as concentrações de ATP e o gradiente electroquímico de prótons.

⇒ **Gradiente electroquímico de prótons**

Se os prótons existentes na matriz passam para o espaço intermembranar, cria-se um pH ácido neste local. Para além disso, ocorre um aumento e consequente excesso de cargas positivas no espaço intermembranar, cuja diferença com as negativas, facilita o transporte de moléculas para dentro e para fora da matriz. O gradiente electroquímico gera um gradiente de pH através da membrana, e um potencial de membrana através da membrana interna da mitocôndria.

A dissipação deste gradiente (transporte de prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial) é utilizado por um complexo enzimático da membrana interna (a ATP sintetase) para formar ATP. No entanto, o gradiente electroquímico de prótons não é utilizado apenas para a síntese de ATP. Conforme as necessidades específicas da célula, a energia armazenada é usada para outras funções importantes, como o transporte de moléculas e iões para a mitocôndria. Por exemplo, ela é utilizada no transporte de ADP, fosfato, piruvato e cálcio (importante regulador da actividade enzimática).

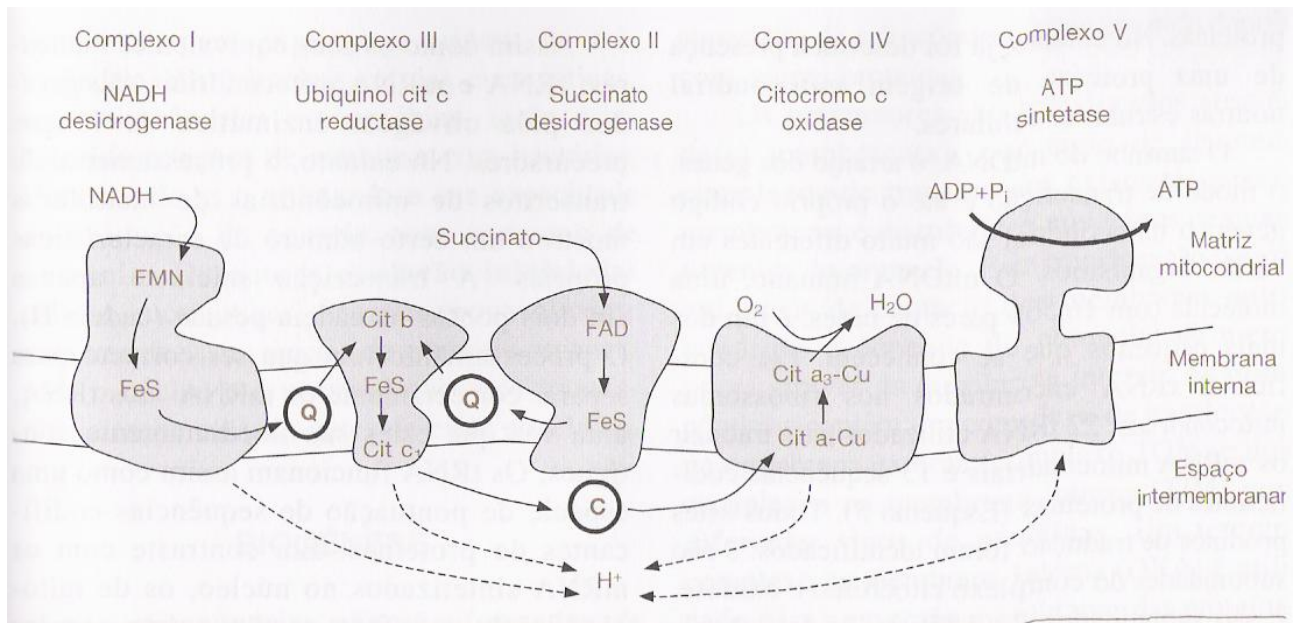


O gradiente de pH serve para o transporte de piruvato para o interior da célula. No caso das células eucarióticas, o ião transportado era o Na^+ e nos procariotas era o H^+ . Aqui nas eucarióticas, o ião que vai ser cotransportado é o H^+ , logo o cotransporte é simporte. O P_i vai ser transportado por simporte, transporte activo secundário e a favor do seu gradiente de concentração.

⇒ **Cadeia respiratória**

A cadeia respiratória permite que a grande quantidade de energia libertada pela redução de oxigénio a água ocorra em várias pequenas reacções de oxidação/redução, de maneira a que possa ser armazenada em vez de se dissipar sob a forma de calor. Cinco complexos enzimáticos de múltiplas unidades polipeptídicas (complexos I a V), juntamente com a ubiquinona (coenzima Q) e o citocromo c, constituem a cadeia respiratória ou cadeia de transporte de electrões. A maior parte dessas estruturas são componentes intrínsecos da membrana interna mitocondrial.

- ✚ **Ubiquinona (Coenzima Q)** – pequena molécula hidrofóbica (membrana interna)
- ✚ **Citocromo c** – presente no espaço intermembranar
- ✚ **NADH desidrogenase ou NADH reductase** – proteínas com flavina, ferro e enxofre, que recebem os electrões do NADH
- ✚ **Succinato redutase** – proteínas com ferro e enxofre
- ✚ **Complexo bc1 ou citocromo c reductase** – citocromos e proteínas com ferro e enxofre
- ✚ **Citocromo c oxidase** – citocromos e proteínas com cobre



8.4. ATP sintetase

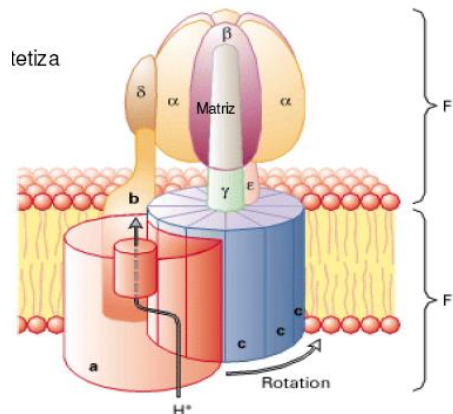
O H^+ existe em maior concentração no espaço intermembranar, existindo assim um canal que permite a passagem de H^+ para o interior da matriz, a favor do gradiente. Quando isto acontece, vai ser accionado um mecanismo que faz com que a bomba funcione e produza energia suficiente para se ligar ao P_i e, portanto, produzir ATP.

Assim sendo, esta molécula enzimática é reversível, pois tanto sintetiza como hidroliza ATP. Imaginando que ocorre uma acumulação de ATP, ou que, pelo contrário, não existem iões H^+ , ou que as concentrações de ADP e P_i dentro da matriz são baixas, o que vai acontecer é que automaticamente a bomba funciona em sentido contrário para reequilibrar as concentrações de ADP, P_i e ATP, originando novamente um gradiente electroquímico de protões.

Com isto, conclui-se que este gradiente tem sempre de estar presente. Caso contrário, todo o mecanismo pára e a bomba deixa de funcionar, não havendo produção de ATP que é necessário para o bom funcionamento da célula.

Através deste mecanismo, é possível compreender que a morte celular programada está relacionada com a cadeia respiratória de electrões, sendo que existe um conjunto de processos de sinalização neste processo. Moléculas que se ligam à membrana mitocondrial vão formar poros fazendo com que o citocromo c passe para o citosol e deixe o espaço intermembranar. Consequentemente, não vai haver transferência de electrões, pelo que a síntese de ATP diminui e a célula irá sentir essa diferença.

A mitocôndria é uma organela que contém DNA, que sofre replicação, sendo que esta não ocorre só na fase S do ciclo celular mas também no núcleo. Esta replicação pode fazer-se ao longo de todo o ciclo, sendo possível que algumas moléculas se repliquem mais que outras. No entanto, o factor mais importante é que ocorra a **duplicação do DNA mitocondrial**.



8.5. Intervenção das mitocôndrias no processo de transcrição

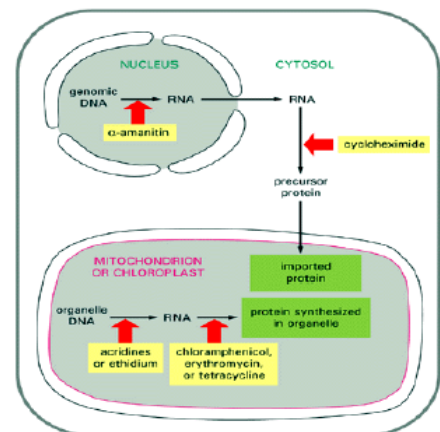
O processo de transcrição é um processo **simétrico**, isto é, só existe um promotor onde se vai ligar a RNA polimerase e que vai transcrever toda a molécula de DNA. Seguidamente, ocorre o processamento, originando as chamadas cadeia pesada e cadeia leve, que depois de processadas vão dar origem às moléculas de rRNA, mRNA e tRNA.

Sendo assim, a **cadeia pesada** origina:

- ✚ 2 rRNA que existem a nível da mitocôndria;
- ✚ Todas as moléculas de rRNA;
- ✚ 10 moléculas de RNA poly-A (mRNA).

Por sua vez, a **cadeia leve** origina:

- ✚ 8 moléculas de tRNA;
- ✚ 1 RNA poly-A (mRNA).



8.6. Semelhanças entre mitocôndrias e células procarióticas

Como provêm de seres procarióticos, tudo o que inibe a síntese proteica dos seres procarióticos, inibe também a síntese proteica do DNA mitocondrial. O principal exemplo são os antibióticos que interferem com a síntese de proteínas dos seres procarióticos, porque também intervêm com a síntese proteica a nível da mitocôndria.

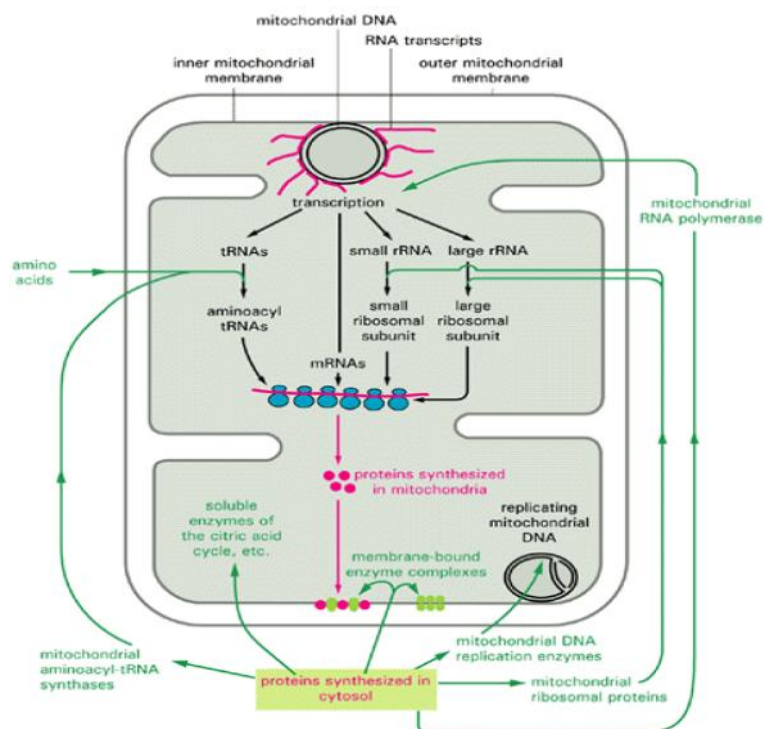
O início da síntese das proteínas é idêntico pois não existe o *cap* e o codão AUG a provocar a síntese, mas sim uma sequência de 6 nucleótidos que vão ser indicadores do início da síntese das proteínas. Por outro lado, também têm alguns codões que são diferentes dos seres eucarióticos, podendo ser lidos de maneiras diferentes e originar moléculas diferentes. Em suma, as principais semelhanças são: serem ambos inibidores da síntese, controlarem o início da síntese proteica e terem DNA circular.

8.7. RNA e proteínas mitocondriais

Existe um promotor e toda a molécula de DNA vai ser transcrita dando origem ao tRNA, rRNA e depois aos RNA-polyA. Para ocorrer o processo de transcrição são necessários factores de transcrição e RNA polimerases provenientes do citosol e que vão ser transportadas para a mitocôndria para intervirem neste processo.

Os ribossomas são constituídos por RNA e proteínas sintetizadas, não na mitocôndria mas que provêm do citoplasma. Para se dar o processo de tradução, existem várias enzimas, sendo as principais a aminoacetilsintetase e a peptidiltransferase que são sintetizadas também no citosol.

Durante o processo de evolução, houve transferência de genes da mitocôndria para o núcleo, pois inicialmente todas as enzimas sintetizadas no citosol existiam nos seres procarióticos que eram autônomos, e que tinham ao nível do DNA os genes que codificavam estas proteínas. À medida que houve evolução foram, então, sendo transferidos para o núcleo.



9. Cíliosqueleto

Depois de um período em que o protoplasma foi descrito como uma substância homogênea e transparente, começaram a surgir descrições da presença, no seu seio, de elementos figurados sob a forma de grânulos, fibrilas e vacúolos. Na sequência da observação, em vários tipos celulares, da presença de componentes fibrosos, surgiram duas teorias: a teoria fibrilar e a teoria reticular.

Em qualquer delas está implícita a existência de uma armação estrutural ou cíliosqueleto. Para a teoria fibrilar o protoplasma era formado por numerosas fibrilas entrecruzadas, no seio de uma substância

homogênea. Segundo a teoria reticular, os filamentos constituíam uma rede de elementos anastomosados. As várias teorias sobre a natureza do protoplasma, surgidas na sequência da aplicação das mais variadas técnicas de coloração e de impregnação, foram entretanto sujeitas a intensa crítica pelos que consideravam que os agentes utilizados alteravam as estruturas, produzindo artefactos.

Núcleo, organelos e outras formações encontrar-se-iam incluídos no seio de uma substância transparente ou translúcida, mais ou menos viscosa, o hialoplasma ou substância fundamental. Hoje sabemos que o citoplasma é estruturado por um conjunto de estruturas filamentosas, de natureza proteica, formando uma rede dinâmica, altamente complexa e interdependente denominada **citosqueleto**.

As funções atribuídas ao citosqueleto dependem não só das características dos seus elementos constituintes, mas também das propriedades de um grande número de proteínas acessórias que com ele se associam, nomeadamente permitindo interacções entre os seus vários elementos e destes com outras estruturas celulares. Nos últimos anos, a possibilidade de envolvimento de componentes do citosqueleto, em funções menos óbvias, como a transdução de sinais e o estabelecimento, manutenção e função de domínios citoplasmáticos, nomeadamente através do envolvimento na segregação intracelular de proteínas e mRNA, tem aumentado ainda mais o interesse por este conjunto de estruturas. Morfológica, bioquímica e funcionalmente distinguem-se três grandes sistemas de estruturas filamentosas: os microtúbulos, os filamentos de actina e os filamentos intermédios, que podem funcionar de modo integrado, embora apresentem padrões de organização, dinâmica e funções específicas.

9.1. Filamentos de actina / Microfilamentos

⇒ Constituição

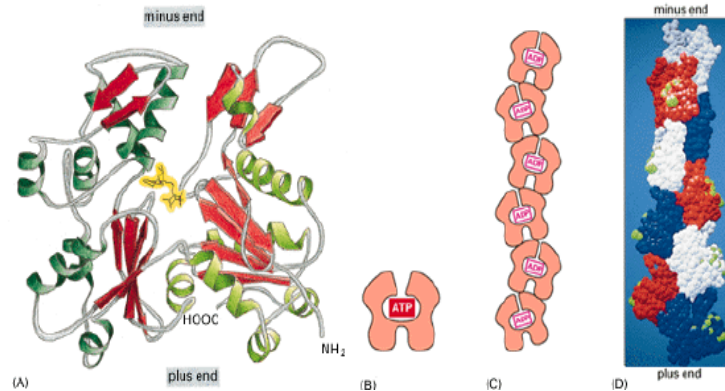
Os microfilamentos ou filamentos de actina são estruturas filamentosas de cerca de 5-7 nm de diâmetro que se observam no citoplasma das células eucarióticas sob a forma de feixes de filamentos paralelos ou de redes de filamentos anastomosados.

São particularmente evidentes no citoplasma cortical, em estreita associação com a membrana e no eixo de prolongamentos celulares. São constituídos fundamentalmente pela polimerização de uma proteína globular denominada **actina G**, que é uma das proteínas mais abundantes nas células eucariotas, originando filamentos de **actina F**.

A estrutura dos monómeros não é conhecida, mas os dados existentes apontam para que tenham forma em *halter*. Admitia-se que os microfilamentos eram constituídos por duas cadeias de actina F enroladas helicoidalmente, mas a utilização de técnicas de reconstrução de imagem e de simulação por computador indicam, como modelo mais provável, o de um filamento helicoidal formado por uma cadeia simples de monómeros.

A organização espacial dos microfilamentos é muito variável e complexa nas células não musculares. Nas regiões submembranares do citoplasma, organizam-se em redes de malhas, mais ou menos apertadas, em pequenos feixes ou, como acontece nos fibroblastos e em células em cultura

constituindo feixes longos e densos – as fibras de stress. Os feixes de microfilamentos que se observam no eixo dos prolongamentos celulares têm aspecto variável, caracterizando-se pelo número e regularidade de orientação dos seus elementos.



Os microfilamentos encontram-se em todo o citoplasma, embora se localizem, preferencialmente, na região cortical das células, que é a área adjacente à membrana plasmática. Define-se, assim, uma rede cortical de microfilamentos, que em associação com a miosina parece exercer papéis importantes na fagocitose, na citocinese (através do anel contráctil na zona de separação das duas células filhas) e na locomoção celular.

⇒ **Proteínas de polimerização e seus efeitos neste processo**

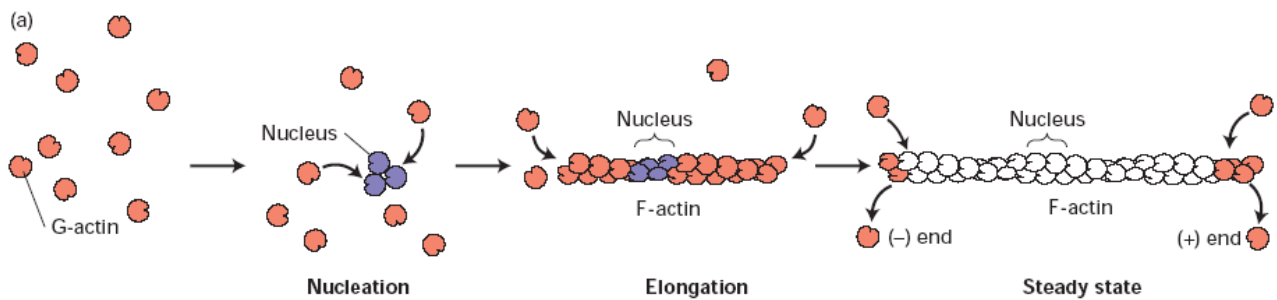
Nos mecanismos de polimerização e despolimerização dos filamentos de actina, intervêm várias proteínas que se encontram associadas aos filamentos, sendo responsáveis basicamente pela estabilização do filamento, pela regulação do seu comprimento e pela organização espacial.

As proteínas associadas que participam na regulação dinâmica de polimerização dos microfilamentos actuam por vários mecanismos:

✚ Sequestro de monómeros de actina G, limitando a sua polimerização (Profilina)

Uma das proteínas citosólicas que intervém na polimerização dos microfilamentos é a **profilina** que tem a capacidade de se ligar aos monómeros de ATP-actina, formando um complexo estável. Na maior parte dos casos, a profilina pode moderar 20% da actina não-polimerizada nas células, sendo este um nível relativamente baixo para que actue como proteína efectiva.

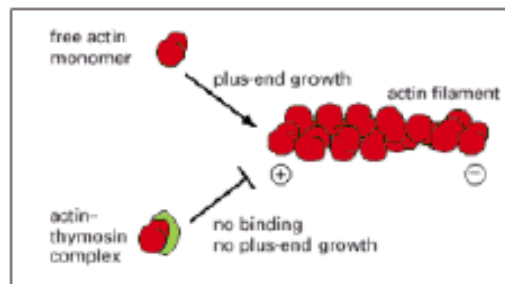
Inicialmente, a profilina promove o reconhecimento dos filamentos de actina como sendo um factor de troca de nucleótidos. Assim, só interage com componentes da membrana que estejam envolvidos em sinalização celular, o que sugere que ela seja particularmente importante no controlo do reconhecimento da actina na membrana plasmática.



✚ Associação lateral a segmentos dos filamentos, impedindo a sua fragmentação

Devido à abundância no citosol e habilidade de ligação ao complexo ATP-actina G (mas não actina F), a **timosina** é considerada a principal proteína relacionada com a actina existente nas células. A sua ligação ao ATP-actina G previne a sua polimerização e, conseqüentemente, a timosina vai funcionar como um moderador nos monómeros de actina num equilíbrio em que um aumento da concentração citosólica da timosina irá provocar um aumento da concentração das subunidades de actina e uma conseqüente diminuição da concentração de actina F.

Isto acontece na medida em que os filamentos de actina estão em equilíbrio com os seus monómeros. Este efeito da timosina nos níveis de actina F foram experimentados laboratorialmente em células vivas.



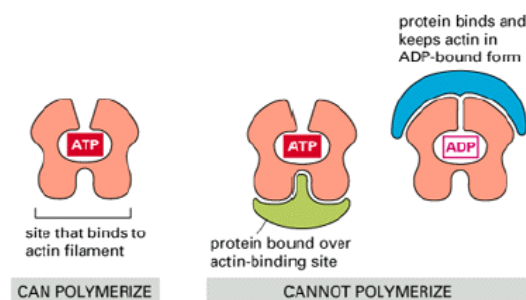
✚ Ligação a uma extremidade dos filamentos de actina F, impedindo o crescimento ou dissociação

Por fim, o último modo de actuação das proteínas na polimerização dos microfilamentos do citosqueleto está relacionado com a inibição da formação da actina F, sendo que este processo ocorre através da **ADF (actin depolymerizing factor)**.

⇒ **Modo de actuação**

Quando se encontra associado a uma molécula de ATP um determinado monómero e ocorre a polimerização, dá-se a hidrólise do ATP, formando-se um filamento de actina. A actina está associada à miosina, importante no contracção muscular, no movimento celular e na forma da célula. No caso dos eritrócitos, a actina estava associada à espectrina, tornando-se lógico que tenham acção na morfologia da célula e quando recebem um estímulo exterior sofrem alteração e com isto induzem a alteração da morfologia celular.

A actina G é associada à molécula de ATP para se dar a polimerização e a despolimerização, e a molécula de ADP tem de passar a ATP. Os filamentos de actina e os microtúbulos contêm, para estarem estabilizados, outras moléculas que podem associar-se ao filamento ou aos monómeros. As proteínas associadas aos filamentos podem impedir que o filamento sofra despolimerização, regular o seu comprimento e impedir que ocorra a substituição da molécula de ATP pela de ADP, ou pela organização espacial dos filamentos.

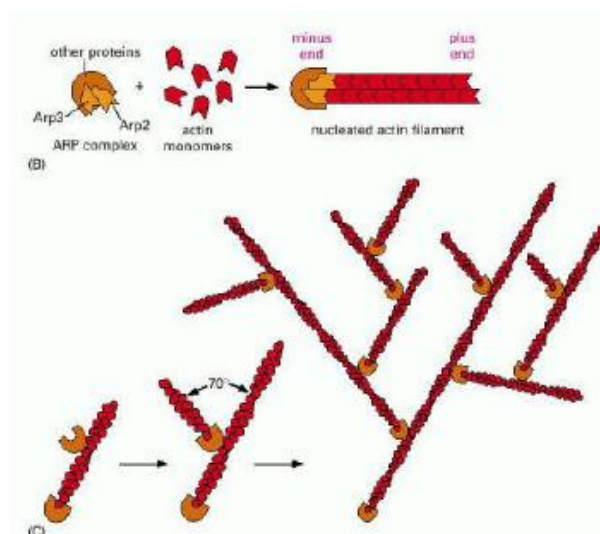


⇒ Nucleação dos filamentos de actina

Uma família de *actin-related proteins* (ARPs) exibindo 50% da sua sequência como sendo similar à actina, foi identificada em vários organismos eucarióticos. Um dos principais grupos de ARPs, um complexo de sete proteínas, designado **Arp 2/3**, estimula a ligação da actina.

Isoladamente dos extractos celulares na base da sua habilidade para ligar a profilina, o complexo Arp 2/3 liga-se a 70º da parte lateral do filamento de actina para originar um filamento-filho. A combinação dos filamentos-mãe e filho cria uma rede em que o complexo Arp 2/3 se encontra localizado nos pontos de ramificação.

Assim, como resultado, os segmentos finais dos filamentos agora criados sofrem alongamento, e são capazes de criar uma força para empurrar a membrana para a frente. É importante referir que a ramificação é estimulada pela família de proteínas WASp, sob o controlo das GTPases. As proteínas de ligação das actinas como a filamina estabilizam a rede de ramificação onde as proteínas de rompimento de actina como a cofilina induzem a desconexão das estruturas previamente ramificadas.

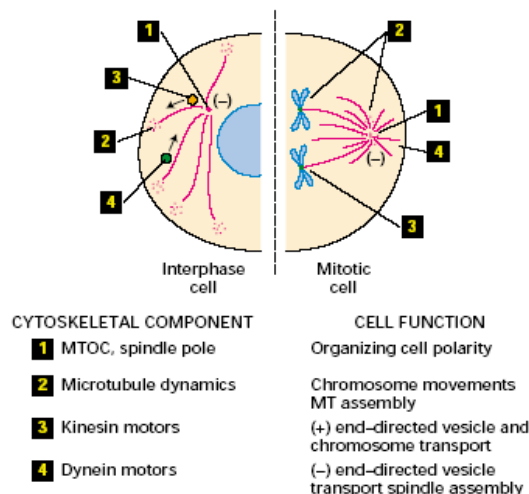
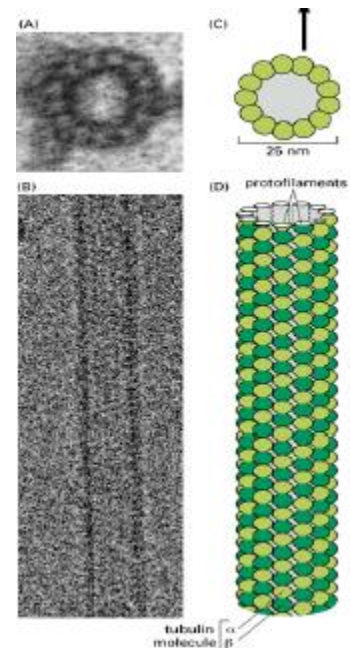


9.2. Microtúbulos

Os microtúbulos são estruturas tubulares com cerca de 25 nm de diâmetro. Em corte transversal, têm perfil circular, podendo reconhecer-se uma zona central pouco densa com 15 nm de diâmetro, limitada por uma parede com 5 nm de espessura. Em corte longitudinal, isolados ou em feixe, seguem trajetórias rectilíneas ou ligeiramente curvas e têm aparência rígida, logo o seu comprimento é variável podendo atingir vários μm .

Foram inicialmente observados como componentes de estruturas celulares complexas, como o centríolo, corpúsculos basais, fibras de fuso e axonemas de cílios e flagelos. Os microtúbulos citoplasmáticos que se observam isolados, em feixes paralelos ou constituindo conjuntos muito ordenados são considerados como componentes do citosqueleto. O padrão da sua distribuição celular e as suas modificações em diferentes situações são facilmente apreciadas pela técnica de imunofluorescência.

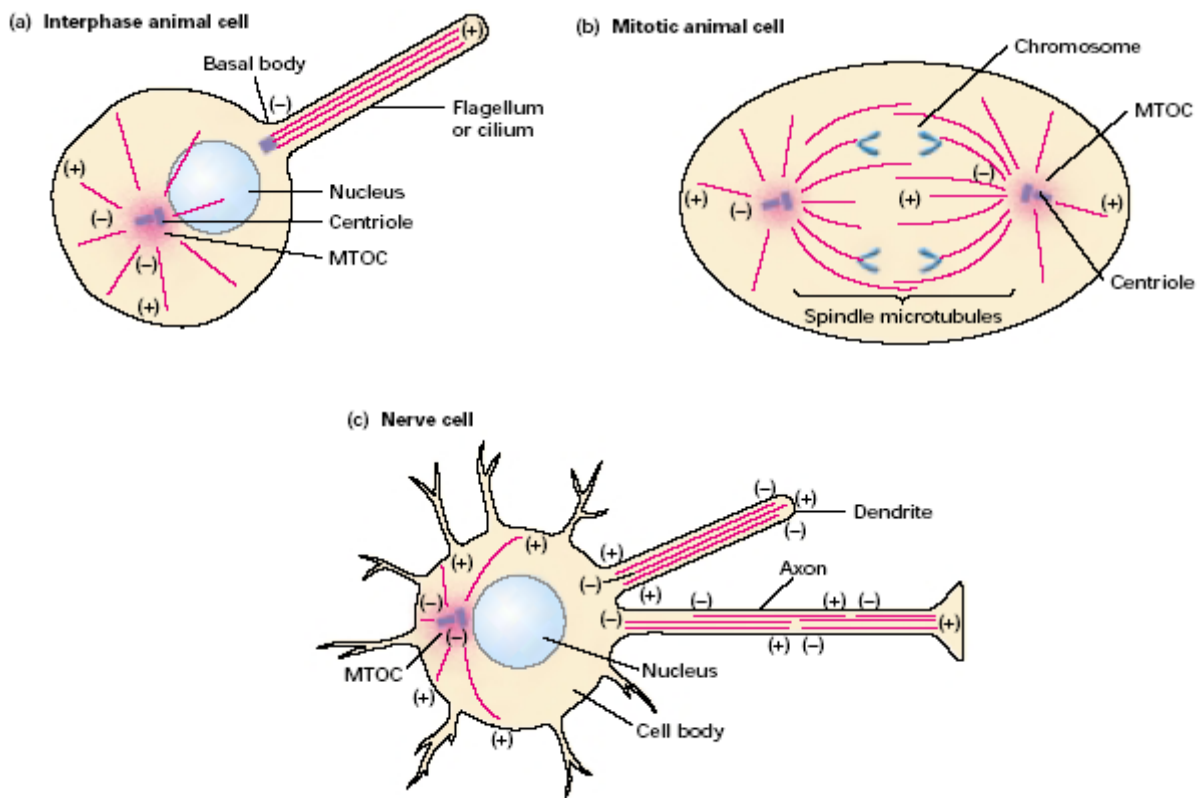
Basicamente, os microtúbulos são constituídos pela polimerização de um heterodímero de tubulina α e tubulina β , originando uma parede constituída por 13 protofilamentos alinhados longitudinalmente. As tubulinas α e β são proteínas globulares, que nos vertebrados são codificadas por uma família de genes muito conservados durante a evolução.



⇒ Orientação celular dos microtúbulos

Os microtúbulos e os protofilamentos que os constituem são estruturas polarizadas cujas extremidades têm propriedades diferentes, exibindo polaridade estrutural e funcional. À extremidade a que se associam preferencialmente novas subunidades dá-se a designação de extremidade mais (+) à oposta de extremidade menos (-). A primeira é capaz de crescimento mais rápido que a segunda, tendendo esta até a perder subunidades caso não seja estabilizada.

Na célula em interfase, os microtúbulos estão organizados de modo polarizado, sendo que as extremidades (+) apontam para a periferia celular e as extremidades (-) partem de uma região que as estabiliza. Esta região, denominada **centro organizador de microtúbulos (MTOC)** na maior parte das células animais em ciclo celular, corresponde ao centróssoma.

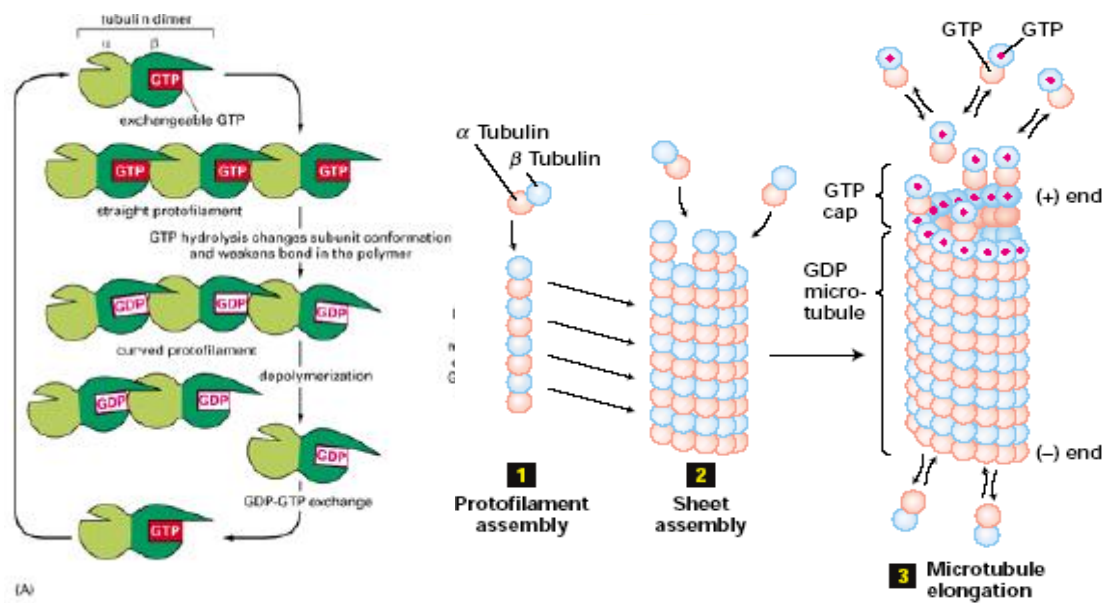


⇒ Formação de um microtúbulo

O primeiro passo no processo de formação de um microtúbulo é a **nucleação**, e requer a presença de tubulina, Mg^{2+} e GTP, a uma temperatura de 37 °C. Esta fase é relativamente lenta até que o microtúbulo esteja a começar a formar-se. De seguida ocorre a segunda frase designada **elongação**, que ocorre de forma muito mais acelerada.

Na nucleação, forma-se um heterodímero devido à junção de uma tubulina α com uma tubulina β . Depois, este complexo anexa-se a outros dímeros para formar oligómeros, que se alongam para formar os protofilamentos. Cada um dos dímeros transporta, normalmente, duas moléculas de GTP que aparentam ter funções de ligação às moléculas de tubulina β . Quando esta ligação ocorre, o GTP é hidrolisado a GDP e os oligómeros podem, por vezes, juntar-se a microtúbulos já formados.

No interior da célula, os microtúbulos formam-se numa área junto ao núcleo, o MTOC. Quando o GTP é adicionado, tem a capacidade de quebrar o GDP, através da remoção de um grupo fosfato (P_i). Consequentemente, o papel usual da hidrólise do GTP pode actuar de forma a promover o constante crescimento dos microtúbulos à medida que eles vão sendo necessários na célula.



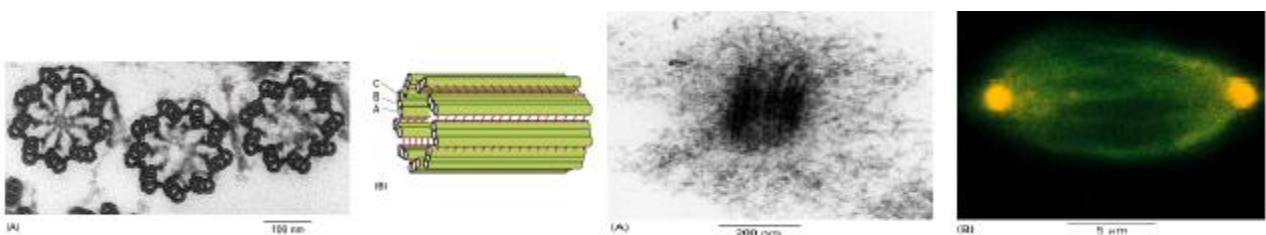
⇒ Localização dos microtúbulos

Os microtúbulos localizam-se como componentes do fuso acromático, dos centríolos, dos cílios, dos flagelos e dos corpos basais. Assim sendo, as suas principais funções são:

- ✚ Movimentos dos cromossomas durante a mitose;
- ✚ Movimento das organelas;
- ✚ Transporte intracelular de materiais;
- ✚ Mobilidade intracelular;
- ✚ Secreção de moléculas.

⇒ Centros organizadores microtubulares

✚ **Centrossomas** – estão localizados num dos lados do invólucro nuclear. Embebido nos centrossomas, está um par de centríolos, constituído por nove grupos de 3 microtúbulos. A matriz pericentriolar é constituída por proteínas (tubulina γ), parte do centrossoma responsável pela nucleação dos microtúbulos. Devido ao fato de os microtúbulos crescerem a partir do centrossoma, este é, então, considerado um dos centros organizadores dos microtúbulos.



✚ **Corpos basais** – os microtúbulos do axomea inserem-se a nível citoplasmático no corpo basal ou cinetossoma. Este trata-se de um cilindro oco, cuja parede é constituída por 9 tripletos de microtúbulos. Aos tripletos estão associadas inúmeras outras proteínas que constituem a matriz do corpo basal e que asseguram, quer a sua fixação ao citosqueleto celular, quer a sua motilidade. O corpo basal possui várias actividades enzimáticas, tais como a fosforilase de nucleósidos purínicos e a ATPase Ca^{2+} - Mg^{2+} dependente, que se encontram envolvidas na transdução de sinais que regulam a motilidade celular.

✚ **Cílios e flagelos** - os cílios são projecções citoplasmáticas móveis, contendo no seu interior um citosqueleto embebido por uma matriz proteica e rodeado por uma diferenciação da membrana celular. A função dos cílios destina-se a facilitar a locomoção celular, e a deslocar fluidos ou células na superfície das células epiteliais. Os flagelos das células eucarióticas possuem uma estrutura semelhante à dos cílios, encontrando-se nos protozoários flagelados, células vegetais. Contudo, são mais longos em geral, em menor número. Assim sendo, os cílios têm movimento em chicote, enquanto que os movimentos flagelares são do tipo sinusoidal. A organização ultrastutural do citosqueleto do cílio ou do flagelo designa-se axonema.

⇒ **Proteínas associadas aos microtúbulos**

O estudo da formação de microtúbulos *in vitro*, a partir de tubulina purificada, levou à identificação de um conjunto de proteínas que co-polimerizam com a tubulina. Genericamente, estas proteínas denominam-se proteínas associadas aos microtúbulos, por a eles se ligarem *in vitro* e *in vivo*. Estas proteínas podem interferir com a ligação dos microtúbulos a outras estruturas celulares, ou com a dinâmica de polimerização e despolimerização, permitindo, deste modo, a modulação das suas funções.

Foram isoladas e caracterizadas duas classes dessas proteínas: as **MAP** (*Microtubule Associated Proteins*) e as **tau** (*Low Molecular Weight Proteins*). Adicionadas a soluções purificadas de tubulina, as MAP:

- ✚ Baixam a concentração crítica necessária à formação dos microtúbulos
- ✚ Favorecem o seu crescimento e diminuem a taxa da sua dissociação.
- ✚ Correspondem às projecções laterais (braços) que se observam na superfície exterior dos microtúbulos.
- ✚ Além de controlarem a sua formação e estabilização, participam nas ligações cruzadas entre microtúbulos vizinhos, com formação de feixes e na ligação de microtúbulos a outras estruturas celulares.
- ✚ Funcionam como alvos dos sinais intracelulares (cAMP, Ca^{2+}) que regulam a organização estrutural e funcional dos microtúbulos, sendo possível que às diferentes espécies moleculares destas proteínas correspondam localizações e funções específicas.

Em sentido lato, podemos também considerar, como proteínas associadas aos microtúbulos, as denominadas **motores moleculares**, que:

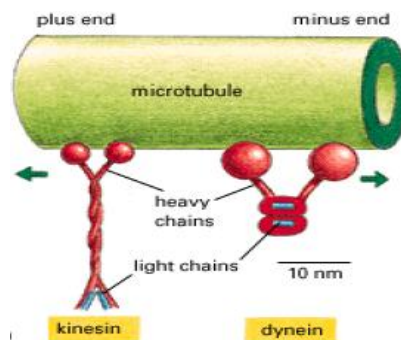
- ✚ São enzimas que associam a energia libertada pela hidrólise de nucleótidos à produção de movimento vectorial ao longo da rede celular de microtúbulos, conferindo assim movimento intracelular a vesículas e organelos.

✚ Ligam-se por uma das extremidades ao microtúbulo e pela outra à estrutura que se movimenta.

✚ São dependentes dos microtúbulos os movimentos, em ambos os sentidos, que se observam entre o corpo celular e aqueles prolongamentos.

Existem, então, dois tipos de proteínas motoras associadas aos microtúbulos:

- Dineínas – possibilitam o movimento em direcção à extremidade (-);
- Cinesinas – possibilitam o movimento em direcção à extremidade (+).



⇒ Efeito de drogas

São conhecidas várias drogas que interferem *in vitro* e *in vivo* no estado de polimerização da tubulina. A mais conhecida é a **colchicina**, que inibe *in vitro* a polimerização da tubulina e provoca *in vivo* a dissociação dos microtúbulos citoplasmáticos. As moléculas de colchicina ligam-se com grande afinidade aos dímeros de tubulina inibindo a sua polimerização.

Também a **vinblastina** se liga às moléculas de tubulina impedindo a sua polimerização e originando a formação de agregados paracristalinos desta proteína.

Em contraste com os anteriores, existe o **taxol**, que se associa a polímeros de tubulina, com uma acção estabilizadora. Assim, baixa a concentração crítica de tubulina necessária à polimerização, que promove mesmo em condições desfavoráveis (ausência de MAP e GTP, baixas temperaturas).

A utilização experimental destas substâncias tem sido muito proveitosa nos estudos sobre a formação e funções dos microtúbulos.

9.3. Filamentos intermédios

Os filamentos intermédios são estruturas formados por membros de uma família de proteínas relacionadas entre si. Os filamentos intermédios têm um diâmetro compreendido entre o dos microfilamentos e os microtúbulos. A maior parte dos filamentos intermédios estão localizados no citosol entre o envelope nuclear e a membrana celular, sendo que as lâminas nucleares se encontram no núcleo da célula. Normalmente, os filamentos intermédios são abundantes nas células sujeitas a um stress mecânico.

⇒ Estrutura

A estrutura dos filamentos intermédios é extremamente condensada. Cada proteína tem um domínio globular nos terminais N e C, que rodeiam o domínio hélice- α . O bloco básico de construção dos filamentos intermédios é um dímero paralelo, formado através da interação da cadeia hélice- α para formar um conjunto de estruturas enroladas entre si. Os filamentos intermédios citoplasmáticos ligam-se às unidades não-polares dos filamentos que, de seguida, se ligam a estruturas de maior comprimento.

A orientação anti-paralela dos tetrâmeros significa que ao controlo dos microtúbulos e dos microfilamentos que apresentam uma extremidade positiva e uma negativa, os filamentos intermédios não têm qualquer polaridade.

Geralmente, os microtúbulos não existem nas plantas nem nos fungos, e a sua formação não envolve a hidrólise do ATP ou do GTP.

Quanto aos filamentos intermédios da membrana plasmática, algumas citoqueratinas interagem como desmossomas (adesão célula-célula) e hemidesmossomas (adesão célula-matriz) através de proteínas adaptadoras.

⇒ Tipos de filamentos intermédios

Existem cerca de 70 genes diferentes que codificam várias proteínas dos filamentos intermédios. No entanto, diferentes tipos de filamentos intermédios partilham características básicas: todos são polímeros que geralmente medem entre 9 e 11 nm de diâmetro quando se encontram completamente ligados. Os filamentos intermédios encontram-se subdivididos em cinco tipos, com base nas semelhanças nas sequências dos aminoácidos e na estrutura da proteína.

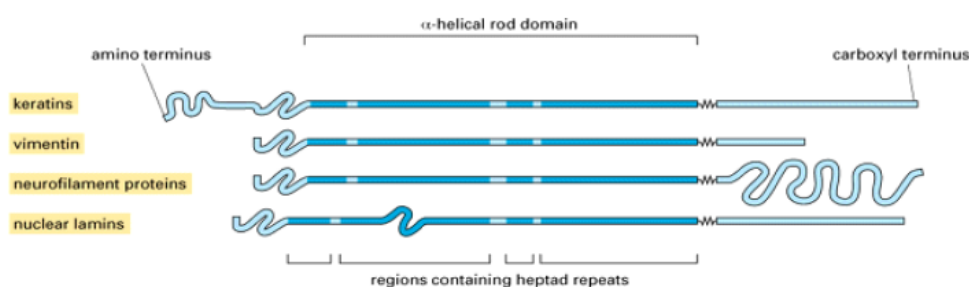
✚ **Tipos 1 e 2 – Citoqueratinas ácidas e básicas-neutras** – são as mais diversas dentro dos filamentos intermédios, estando as diferentes isoformas divididas em dois grupos:

- ✓ Citoqueratinas epiteliais
- ✓ Citoqueratinas tricócíticas

✚ **Tipo 3** – constituído por 4 proteínas que podem formar proteínas homo ou heteropoliméricas: desmina, vimentina, proteína ácida fibrilar e periferina.

✚ **Tipo 4** – constituído pelas 3 proteínas dos neurofilamentos, a nestina e a α -internexina.

✚ **Tipo 5** – constituído pelas lâminas nucleares.



Capítulo 8 – Junções celulares e adesão celular

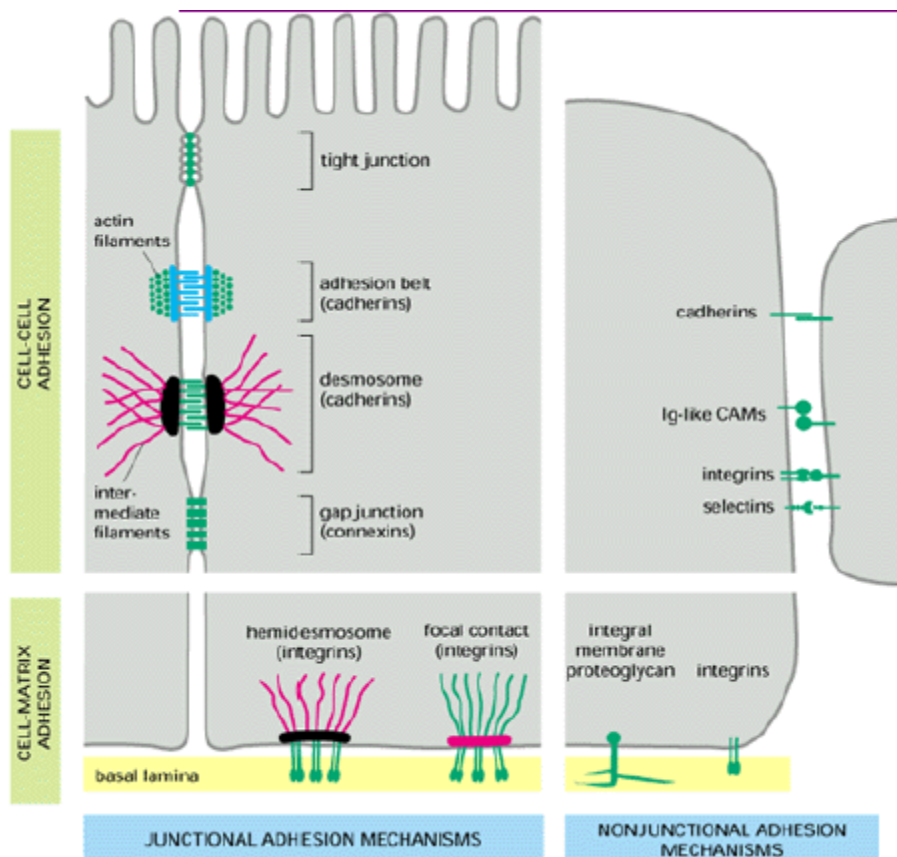
Uma **junção celular** é uma estrutura situada num tecido de um organismo multicelular. As junções celulares são particularmente abundantes nos tecidos epiteliais e consistem em complexos basicamente proteicos que induzem o contacto entre células vizinhas, entre uma célula e a matriz extracelular ou então a construção de barreiras paracelulares de tecido epitelial, controlando o transporte paracelular.

Normalmente, as junções celulares permitem:

- ✚ Conferir uma maior força e rigidez aos tecidos;
- ✚ Transferir a informação entre os espaços intra e extracelular;
- ✚ Controlar a passagem de moléculas ou iões através de camadas celulares;
- ✚ Movimentar iões e moléculas entre citoplasmas de células vizinhas.

Nos vertebrados, existem três principais tipos de junções celulares:

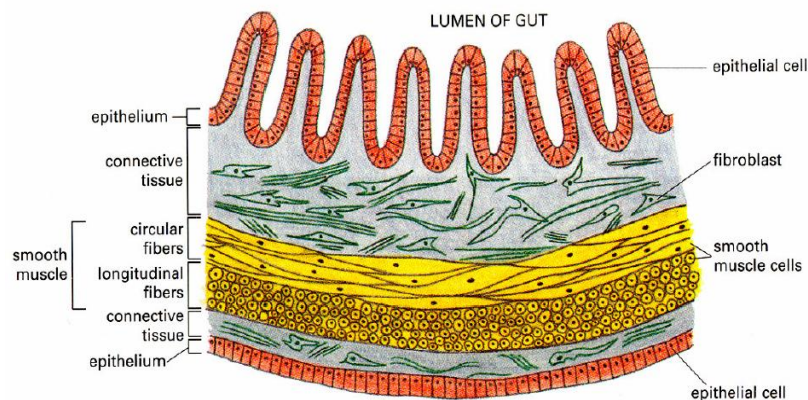
- Junções de ancoragem;
- Junções comunicantes;
- Junções apertadas.



1. Organização dos tecidos

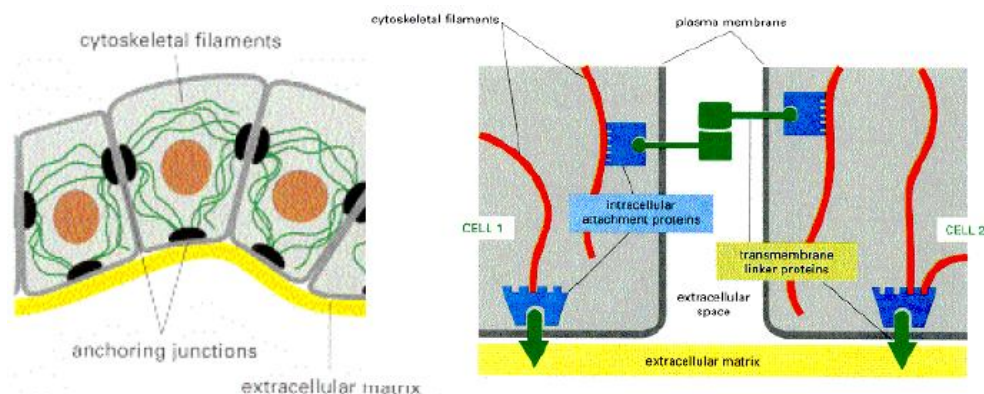
No nosso organismo coexistem vários tipos de tecidos, sendo os mais abundantes o muscular, o epitelial, o sanguíneo, o linfóide e o conjuntivo. Todos eles são constituídos por células e a forma como eles mantêm as células ligadas varia de tecido em tecido.

O **tecido epitelial** é constituído por células polarizadas, sendo que a zona apical é diferente da zona basolateral. As proteínas podem mover-se ao longo da membrana, mas há determinadas células em que isso não acontece e um desses grupos é o das células epiteliais que intervêm nas junções celulares.



2. Junções de ancoragem

Estas junções celulares ligam as células e o seu citosqueleto a células vizinhas ou à matriz extracelular. São maioritariamente abundantes em tecidos que estão submetidos a um stress mecânico severo, como num músculo cardíaco.



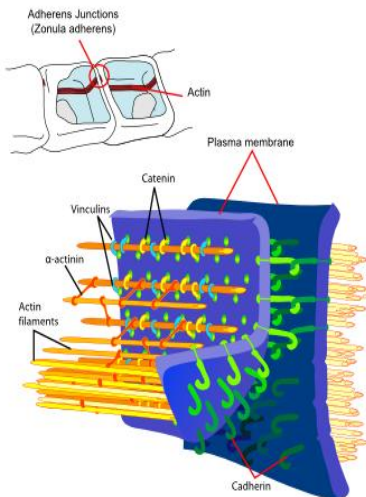
Nas junções de ancoragem intervêm dois principais tipos de proteínas:

- ✚ Proteínas de aderência intracelular – formam uma placa no lado citoplasmático da membrana plasmática e ligam-se a filamentos de actina ou a filamentos intermédios.

- ✚ **Proteínas de adesão transmembranares** – contêm um domínio extracelular que se liga à matriz extracelular ou a domínios extracelulares de proteínas de adesão transmembranares da outra célula. A zona intracelular da proteína liga-se a proteínas de aderência intracelular.

Assim sendo, existem vários subtipos das junções de ancoragem, sendo as principais as junções de aderência, os desmossomas, os hemidesmossomas e as junções focais.

⇒ **Junções de aderência**



As junções de aderência são localizadas abaixo das junções ocludentes nos tecidos epiteliais. Rodeiam completamente as células, constituindo como que um cinto à volta destas. As junções de aderência são uma complexa estrutura formada pelas membranas das células adjacentes, em que as proteínas integrais pertencem à família das caderinas.

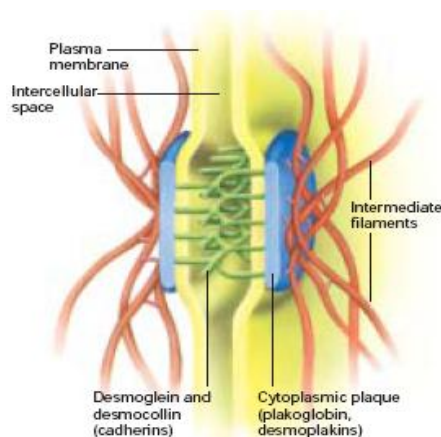
As extremidades das caderinas de cada membrana interpenetram-se no espaço intracelular, constituindo a porção aderente da estrutura. A outra extremidade das caderinas liga-se em cada uma das células adjacentes a proteínas do grupo das cateninas α e β .

Do ponto de vista molecular, estas junções subdividem-se em dois grupos: o primeiro composto pelas que contêm vinculina e talina, e o segundo pelas que não contêm a proteína de 135 kDa, logo conclui-se que as proteínas de aderência se ligam aos filamentos de actina.

⇒ **Desmossomas**

Estas estruturas ocorrem nas membranas de duas células vizinhas, nomeadamente em epitélios. São constituídos por duas placas densas, situadas na porção citoplasmática adjacente às membranas celulares das duas células vizinhas.

Nos desmossomas, as proteínas de aderência ligam-se a filamentos intermédios.

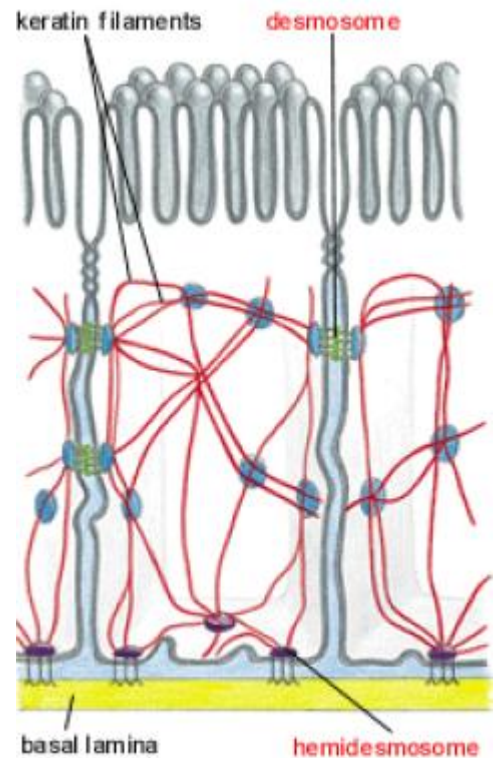


⇒ Hemidesmosomas

São junções morfologicamente semelhantes a desmosomas, mas química e funcionalmente diferentes. Ligam a superfície basal das células epiteliais à lâmina basal subjacente. Os hemidesmosomas contêm vários polipeptídeos, como por exemplo as integrinas que atravessam a membrana celular e se projectam para a lâmina basal.

⇒ Junções focais

São junções semelhantes aos hemidesmosomas, diferindo apenas nos filamentos de citosqueleto durante o processo de junção. Assim sendo, enquanto que nos hemidesmosomas ocorre nos filamentos intermédios, nas junções focais ocorre nos microfilamentos.



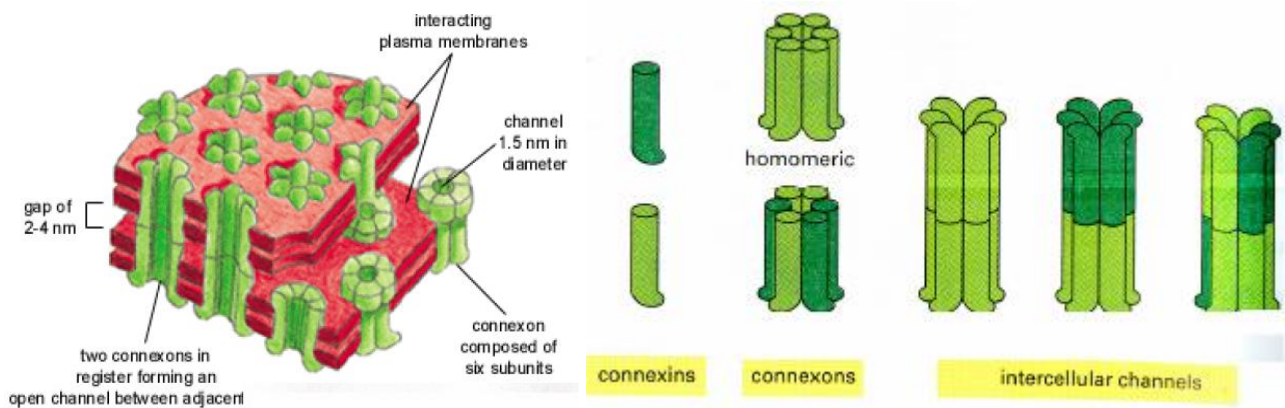
3. Junções comunicantes

As junções comunicantes são estruturas presentes em muitos tecidos e em quase todas as espécies animais. Ao microscópio electrónico, observam-se zonas onde as membranas de duas células adjacentes ficam separadas por um interstício. As junções de cada uma das membranas são constituídas por moléculas proteicas transmembranares que formam estruturas designadas por conexões, cada um formado por seis proteínas idênticas, aderentes entre si.

Estas proteínas pertencem à família das **conexinas**, as quais consistem, nas células humanas, pelo menos em 13 proteínas diferentes. As conexões de duas células vizinhas formam um canal contínuo que conecta as duas células vizinhas.

As junções comunicantes permitem a comunicação entre as células com passagem de pequenas moléculas ou iões. São estruturas dinâmicas que abrem ou fecham sob acção de modificações celulares. O aumento de Ca^{2+} citoplasmático, ou a diminuição de pH intracelular diminuem a permeabilidade das junções. As propriedades funcionais das junções comunicantes são fundamentais na contracção cardíaca, nos movimentos peristálticos do intestino, na embriogénese, e na diferenciação das células germinais.

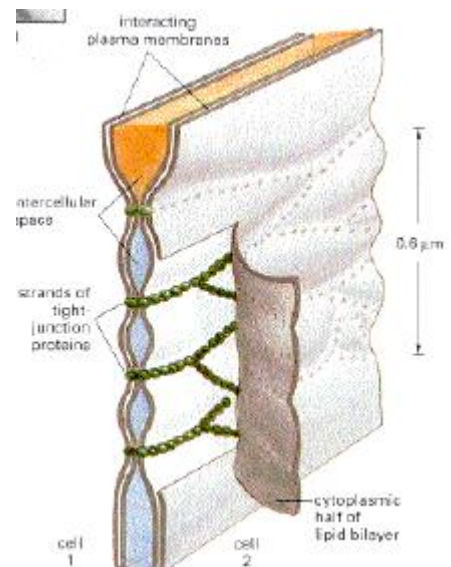
A passagem iónica condiciona uma corrente eléctrica, pelo que também são conhecidas por sinapses eléctricas.



4. Junções apertadas

As junções apertadas ou junções *tight* encontram-se frequentemente na porção apical lateral das células epiteliais de revestimento, sendo constituídas por bandas finas que rodeiam completamente as células e contactam com estruturas idênticas de células adjacentes.

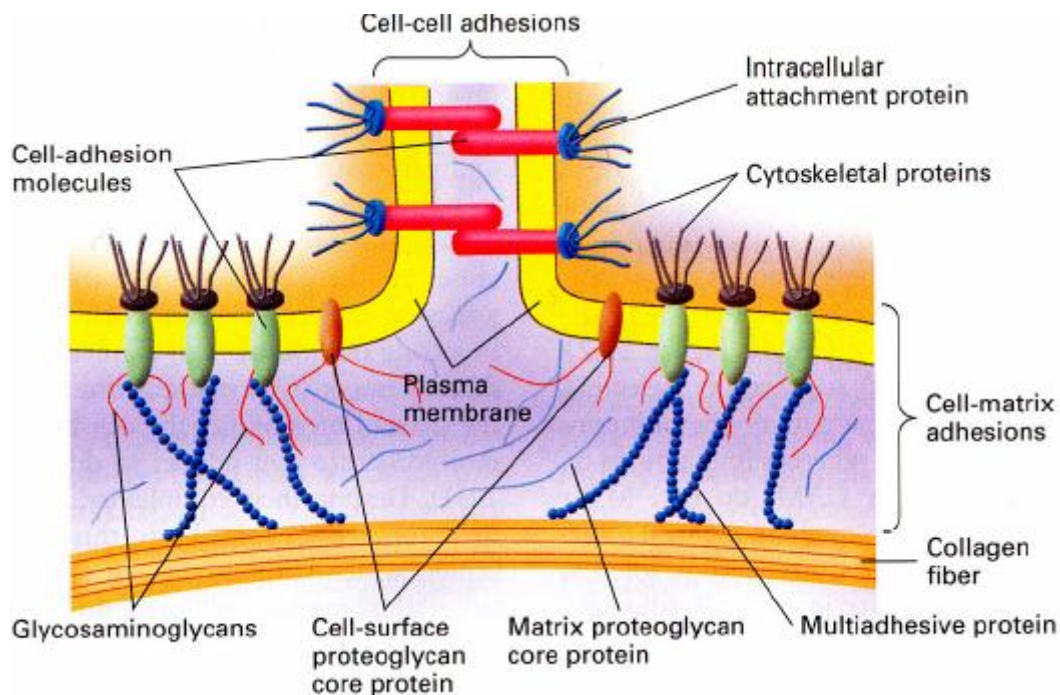
Vistas ao microscópio electrónico, aparecem como uma série de ligações entre os folhetos externos das membranas de células adjacentes, tornando o espaço intercelular impermeável a moléculas, sais e mesmo iões. A observação de microfotografias de tecidos tratados com substâncias coloidais de peso molecular elevado mostra o espaço intracelular preenchido por este produto opaco aos electrões, excepto ao nível das junções ocludentes.



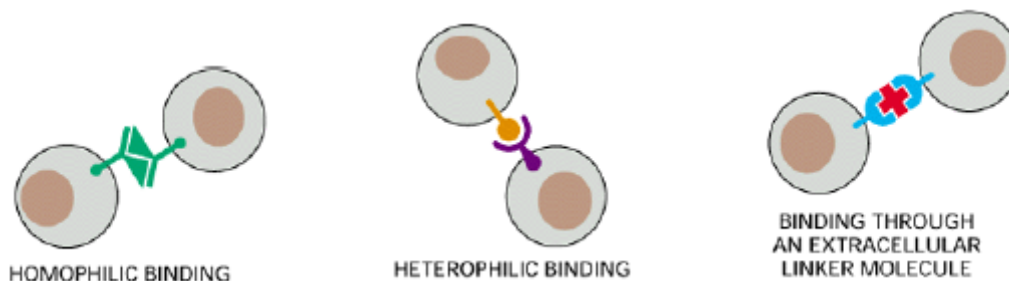
As partículas intramembranares são de natureza proteica – proteínas integrais – e estão presentes em cada uma das membranas das células adjacentes. Entre as mais importantes proteínas destacam-se as claudinas (essenciais para a formação e função das junções) e as occludinas (que apresentam função desconhecida). No entanto, já foram também identificadas outras proteínas como a ZO-1 e a ZO-2, sendo que no ponto de contacto entre as proteínas integrais de cada membrana adjacente, o espaço intercelular é nulo e é um ponto completamente impermeável à passagem de substâncias do lúmen para o espaço intercelular.

5. Moléculas de adesão

A adesão celular não ocorre exclusivamente através das junções celulares mas também a partir de moléculas de adesão que existam nas membranas celulares. Todas as moléculas de adesão são CAMs (*cell adhesion molecules*) existindo, então, várias classes de CAMs consoante a sua dependência relativamente ao cálcio.



Consoante o tipo de moléculas que existam nas duas membranas das células, ou entre a membrana da célula e a matriz extracelular, formam-se **interacções homofílicas** (caso as duas moléculas sejam iguais) ou **heterofílicas** (caso as duas moléculas sejam diferentes). Existe ainda um terceiro caso possível em que as duas moléculas através uma à outra através da acção de uma molécula ligante proveniente do meio extracelular.



5.1. Selectinas

As selectinas constituem uma das famílias das CAMs que estão relacionadas com as interacções leucócitos-células vasculares. Um jogador-chave nestas interacções é a **selectina-P** que se encontra na superfície das células endoteliais.

Todas as selectinas contêm um domínio dependente do Ca^{2+} , localizado na extremidade mais afastada da região extracelular da molécula e reconhece oligossacarídeos em glicoproteínas ou glicolípidos. Assim, as selectinas podem ser caracterizadas como sendo proteínas transmembranares que ligam hidratos de carbono (lectinas) em células.

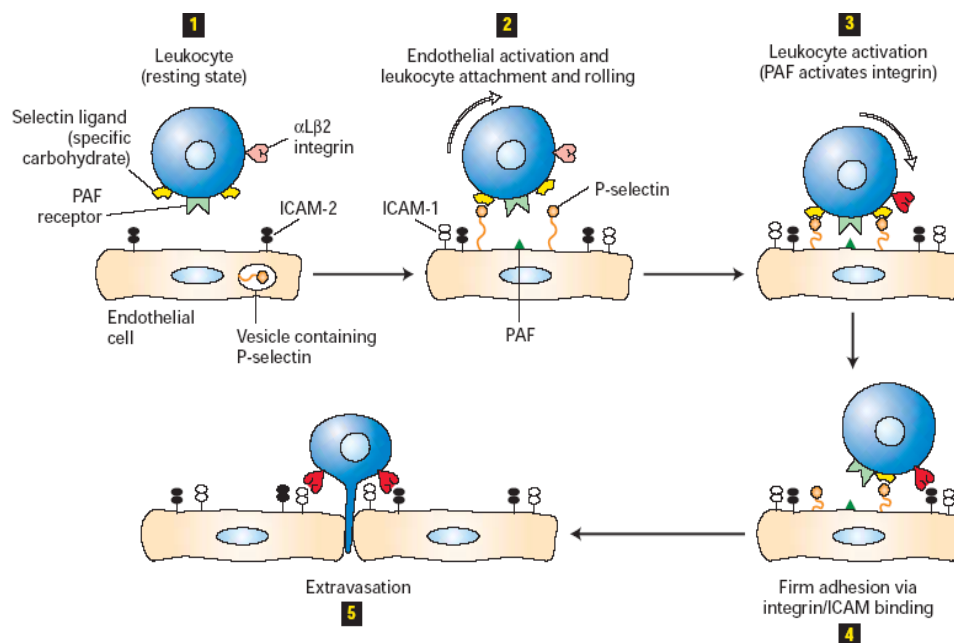
São consideradas importantes nas interações referidas leucócitos-células endoteliais dos vasos sanguíneos (ligação fraca e reversível), permitindo a migração dos leucócitos para os tecidos. Tendo em conta esta caracterização, conclui-se que as selectinas actuam conjuntamente com as integrinas e que existem três principais tipos de selectinas: selectina-L (leucócitos), selectina-P (plaquetas) e selectina-E (células endoteliais activas).

⇒ Migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos

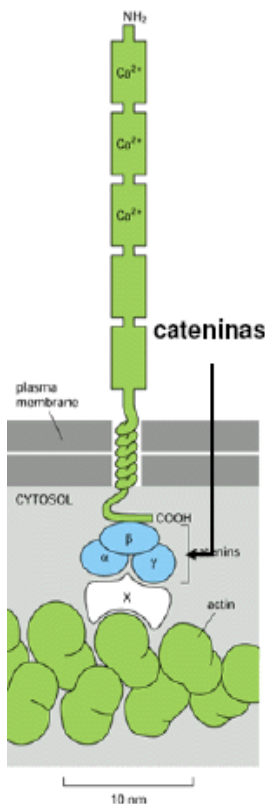
(1) Na ausência de qualquer inflamação ou infecção, os leucócitos e as células endoteliais das paredes dos vasos sanguíneos encontram-se em estado de repouso.

(2) Um conjunto de sinais inflamatórios é libertado em áreas susceptíveis de lesão e activa as células endoteliais que se encontravam em descanso, para que estas movam as selectinas para a superfície celular. As selectinas agora expostas, medeiam a ligação dos leucócitos através da interacção de ligandos de hidratos de carbono com os leucócitos. A activação do endotélio também provoca a síntese do PAF (*platelet-activating factor*) e do ICAM-1, que se vão expressar na superfície celular. O PAF e outros activadores normalmente secretados, induzem depois alterações na forma dos leucócitos, como a $\alpha\text{L}\beta 2$, que se expressa através de linfócitos T. (3)

A ligação subsequente que se verifica entre as integrinas activadas nos leucócitos e as CAMs no endotélio, resulta numa adesão firme (4) e movimento consequente (*extravasão*) para o tecido (5).



5.2. Caderinas



As caderinas são moléculas-chave na adesão célula-célula e na sinalização celular e desempenham um papel extremamente importante durante a diferenciação e manutenção da integridade dos tecidos.

As caderinas E- (epitelial), P- (placenta e epiderme) e N- (nervos e músculos) são as **caderinas clássicas**, sendo as mais frequentemente expressas, particularmente durante o início da diferenciação. Folhas de células epiteliais polarizadas contêm, normalmente, caderina-E em quantidades abundantes, ao longo das suas superfícies laterais. No entanto, ainda que a caderina-E esteja concentrada nas junções de aderência, ela também está presente ao longo das superfícies laterais onde se pensa que ela se liga às membranas celulares adjacentes.

Por sua vez, as **caderinas não-clássicas** são as caderinas dos desmossomas. Os domínios citosólicos das caderinas não-clássicas interagem com a placoglobina (que é similar em estrutura a β-catenina) e com placofilinas. Estas proteínas adaptadoras que formam pequenas placas citoplasmáticas são características dos desmossomas que interagem com os filamentos intermédios. Consequentemente, pode concluir-se que os desmossomas e as junções de aderência estão ligados a fibras de citosqueleto diferentes.

Na membrana plasmática, as caderinas associam-se entre si e formam dímeros ou oligómeros, ou seja, existem ligações homofílicas.

5.3. Proteínas de adesão da superfamília das imunoglobulinas

Numerosas proteínas transmembranares caracterizadas pela presença de vários domínios de imunoglobulina nas suas regiões extracelulares, constituem a superfamília das IgCAMs.

O domínio Ig é uma proteína comum, que contém entre 70 e 110 resíduos e que inicialmente foi identificada em anticorpos. Dentro de todas as IgCAMs existem as seguintes:

- ✚ **NCAMs** (*neural CAMs*) – ligam células através de mecanismos homofílicos e têm um papel importante na diferenciação das células musculares e nervosas. Por vezes podem conter ácido siálico, impedindo a adesão celular.
- ✚ **ICAMs** (*intercellular CAMs*) – transportam os leucócitos para os tecidos e ligam células através de mecanismos heterofílicos.
- ✚ **JCAMs** (*junction CAMs*) – fazem parte das junções apertadas.

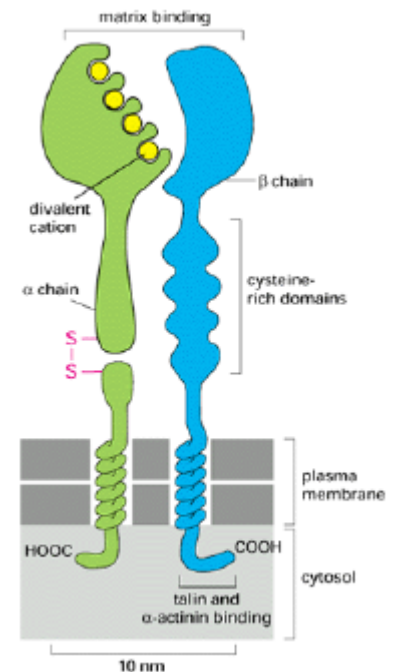
5.4. Integrinas

As integrinas compreendem proteínas integrais heterodiméricas que funcionam como receptores de adesão, mediando várias interações célula-matriz. Nos vertebrados, são conhecidas pelo menos 24 heterodímeros de integrinas, compostos por 18 tipos de subunidades α e 8 tipos de subunidades β .

Assim, uma cadeia β simples pode interagir com qualquer uma das cadeias α , formando integrinas que ligam diferentes ligandos. Este fenómeno de diversidade combinatória permite um número relativamente baixo de componentes para servir um grande número de diferentes funções.

Para além disso, as integrinas ligam-se às lamininas, à fibronectina da matriz extracelular e aos filamentos de actina no lado citosólico, com excepção dos hemidesmosomas que se ligam aos filamentos intermédios.

As integrinas são ainda responsáveis pela activação de vias de sinalização intracelular e por processos de sobrevivência celular (células endoteliais, musculares e epiteliais).



Capítulo 9 – Matriz extracelular

A matriz extracelular é formada por um conjunto extremamente diversificado de moléculas localizadas nos espaços intercelulares dos tecidos, as quais têm a capacidade de interagir formando agregados tridimensionais complexos, ligando-se ainda a receptores celulares específicos.

A matriz extracelular encontra-se particularmente desenvolvida em tecidos que desempenhem predominantemente funções mecânicas ou de suporte, como por exemplo os que constituem os tendões, ossos, cartilagens ou cápsulas fibrosas de diversos órgãos, que se designam **tecidos conjuntivos**. No entanto, todos os tipos celulares têm a capacidade de sintetizar e secretar componentes da matriz, pelo que aquele território extracelular se pode encontrar, em maior ou menor abundância, na globalidade dos tecidos.

O que sucede é que tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo, a matriz extracelular varia de tecido para tecido. Neste contexto, consideram-se dois grandes territórios na matriz extracelular, os compartimentos intersticial e o pericelular.

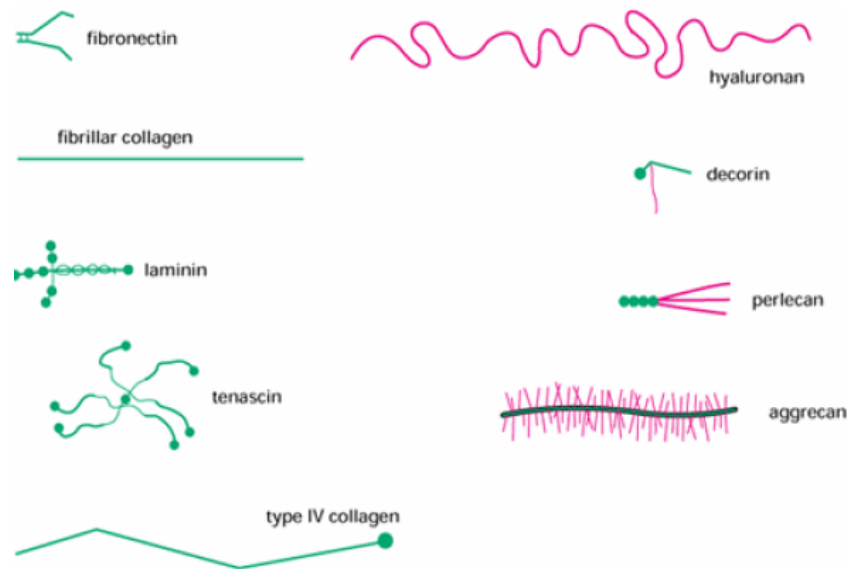
- ✚ **Compartimento intersticial** - está fundamentalmente vocacionado para o desempenho de funções estruturais, sendo especialmente abundante nos tecidos conjuntivos.
- ✚ **Compartimento pericelular** – está fundamentalmente envolvido em processos de modulação do comportamento celular, nomeadamente em fenómenos de adesão, migração, proliferação/apoptose e diferenciação celular. Existe em todos os tecidos e influencia a expressão genética das células que com ele contactam. São exemplos de matrizes pericelulares, as lâminas basais, o glicocálice e a zona pelúcida.

Em suma, as principais funções da matriz extracelular são:

- Organizar os tecidos quanto à sua forma e função;
- Coordenar as funções celulares activando as vias de sinalização celular que controla (sobrevivência, proliferação e diferenciação).

As principais moléculas que intervêm na ligação célula-matriz são as **integrinas** e as moléculas mais abundantes são os proteoglicanos e o colagénio, mas também existem outras bastante conhecidas e importantes.

⇒ Comparação entre forma e tamanho das macromoléculas da matriz extracelular



1. Glicosaminoglicanos (GAG)

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos complexos, geralmente de cadeia linear e elevado peso molecular, existentes na matriz extracelular e à superfície das células, nomeadamente entrando na constituição das lâminas basais e do glicocálice. Podem ainda ocorrer intracelularmente e, em situações patológicas, ser aí acumulados.

São polímeros resultantes da repetição de um dissacarídeo formado por uma N-acetilhexosamina (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina) e um ácido urónico segundo padrões que, por serem característicos, permitem subdividir os GAG em várias populações distintas.

O **ácido hialurónico** é talvez o único GAG que, nos sistemas biológicos, não se encontra associado a proteínas por ligações covalentes. Todos os outros apresentam-se, geralmente, ligados a um componente prático, associação esta que origina macromoléculas designadas proteoglicanos, descritos seguidamente.

2. Proteoglicanos

Os proteoglicanos são um subconjunto das glicoproteínas que contêm cadeias polissacarídicas covalentemente ligadas – os glicosaminoglicanos.

Tal como outras glicoproteínas, os proteoglicanos são sintetizados no retículo endoplasmático, e apresentam, também, cerca de 80% a 90% da molécula constituída por açúcares e apenas uma pequena parte de proteínas, o que confere uma cadeia não ramificada e com uma constituição específica (por ser constituída por dissacarídeos específicos).

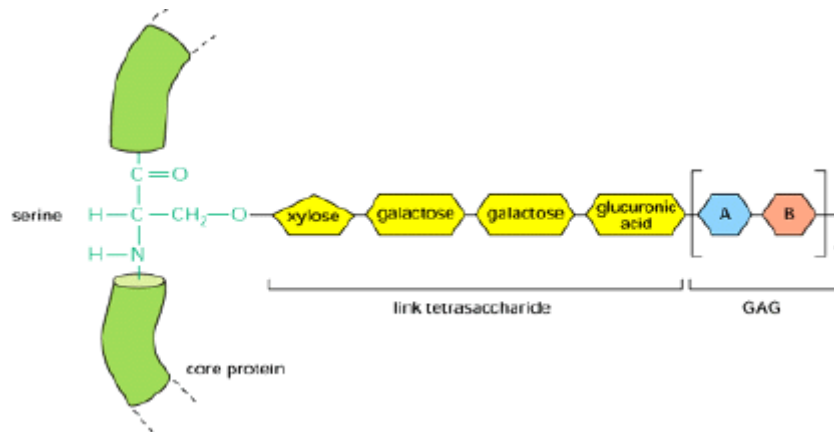
A sua cadeia polissacarídica liga-se a um resíduo de serina e é constituída por xilose, duas moléculas de galactose e ácido glucurónico, a que se seguem sequências repetidas de unidades dissacarídicas.

Os proteoglicanos são secretados pelas células que existem no tecido – os fibroblastos. As principais funções dos proteoglicanos são:

- ✚ Regular o tráfico de moléculas com base no seu tamanho e carga;
- ✚ Controlar a sinalização celular;
- ✚ Regular a actividade das moléculas secretadas.

Tendo em conta a sua constituição, os proteoglicanos podem estar ligados às membranas através da sua parte proteica ou ligados ao glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Exemplos: agregano (cartilagem), perlicano, decorina e sindecano (membranas).



3. Colagénio

O colagénio é uma proteína extracelular fibrosa que desempenha inequívocas funções estruturais, e nas quais uma parte apreciável das suas moléculas tem uma conformação em tripla hélice, que lhe confere uma rigidez considerável.

A formação da tripla hélice está relacionada com a estrutura primária e modificações pós-tradução que ocorrem nas três cadeias polipeptídicas de cada molécula de glicogénio – as **cadeias α**. A estrutura primária destas cadeias é maioritariamente formada por uma sequência de três resíduos de aminoácidos – Glicina, X, Y. Nas regiões X e Y, designadas por domínios colagénicos, os aminoácidos colocados são frequentemente a prolina e a hidroxiprolina, respectivamente.

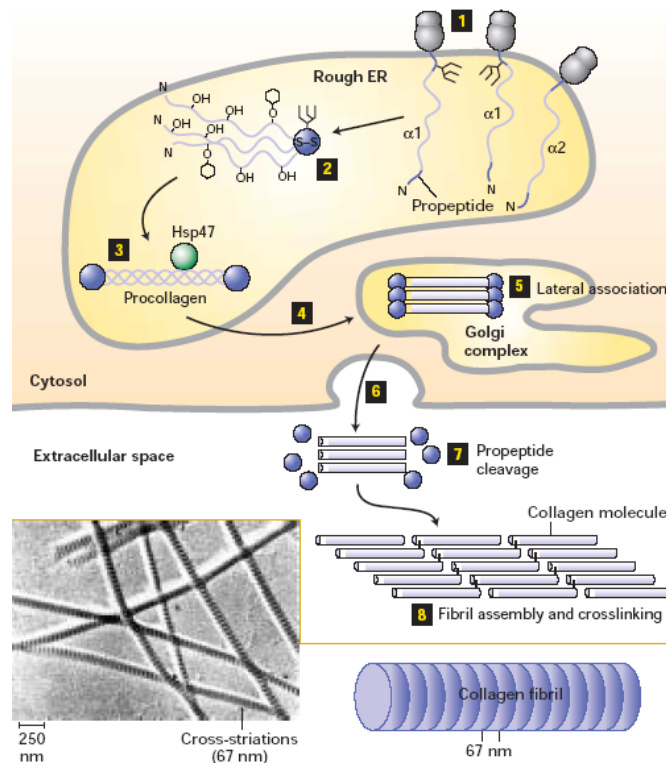
Reconhecem-se, actualmente, cerca de 20 tipos de colagénio, distintos tanto na constituição das suas cadeias α como na sua capacidade de polimerização, na sua localização e nas suas funções específicas. Admite-se que os colagénios mais abundantes são dos tipos I, II e III, sendo que os V e XI também entram na composição de fibrilas cilíndricas que apresentam uma periodicidade transversal – as **fibrilas nativas**. A excepção é o colagénio tipo IV que é um dos principais constituintes das lâminas basais, sendo que da sua polimerização não resultam fibrilas, mas sim uma malha molecular que interage com outros constituintes das lâminas basais.

⇒ Síntese do colagênio

Os colagênios são habitualmente secretados sob a forma de precursores, os **procolagênios**, sendo estes posteriormente clivados extracelularmente para dar origem às moléculas de colagênio propriamente ditas, também designadas por **tropocolagênios**. As moléculas de colagênio têm a capacidade de polimerizar espontaneamente e de forma muito ordenada, originando as fibras de colagênio.

Os vários passos da biossíntese podem ser descritos da seguinte forma:

1 - As cadeias α de procolagênio são sintetizadas nos ribossomas associados à membrana do retículo endoplasmático e os oligossacarídeos de asparagina são adicionados ao terminal C do propéptido. **2** - Os propéptidos associam-se para formar trímeros e estão covalentemente ligados através de pontes dissulfeto, sendo que os resíduos no tripleto Gly-X-Y estão covalentemente modificados. **3** - As modificações facilitam a formação da tripla hélice e a sua estabilização, assim como a ligação de uma proteína chaperona (Hsp47) que estabiliza as hélices ou previne a agregação prematura dos trímeros. **4 e 5** - Os procolagênios formados são transportados para e através do complexo de Golgi, onde ocorre a associação lateral a pequenos feixes. As cadeias são então secretadas (**6**), os terminais N e C dos propéptidos são removidos (**7**) e os trímeros reúnem-se em fibrilas e são covalentemente ligados (**8**).



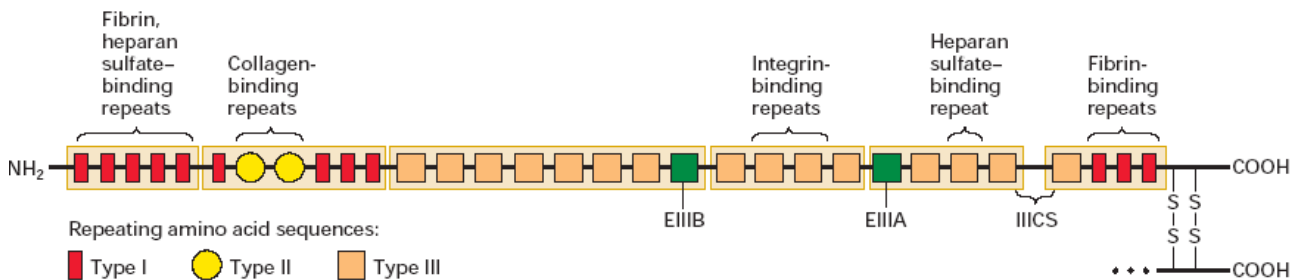
4. Fibronectinas

Vários tipos de células sintetizam a fibronectina, uma proteína abundante na matriz extracelular em todos os vertebrados.

As fibronectinas são essenciais para a migração e diferenciação de vários tipos de células na embriogênese. Estas proteínas são também importantes no anexo das células à matriz extracelular através

da ligação a outros componentes da matriz, particularmente às fibrilas de colagénio, proteoglicanos de sulfato de heparano ou até os receptores de adesão como as integrinas.

Fisicamente, as fibronectinas são dímeros de dois polipéptidos semelhantes ligados ao terminal C, através de duas pontes dissulfeto, que podem existir sob várias isoformas: forma solúvel ou de fibrilas insolúveis (neste caso necessitam de outras proteínas).



5. Lâmina basal

Nos animais, o epitélio e outros grupos organizados de células estão rodeados pela lâmina basal, uma espécie de folha de componentes da matriz extracelular.

A lâmina basal encontra-se diferentemente estruturada, consoante os tecidos. Assim, a lâmina basal desempenha as seguintes funções:

- ✚ Papéis bastante importantes na regeneração, depois de os tecidos serem danificados;
- ✚ Importante no desenvolvimento embrionário, ao auxiliar os embriões de 4 e 8 células a aderirem, formando as esferas embrionárias;
- ✚ Determina a polaridade celular;
- ✚ Influencia o metabolismo celular.

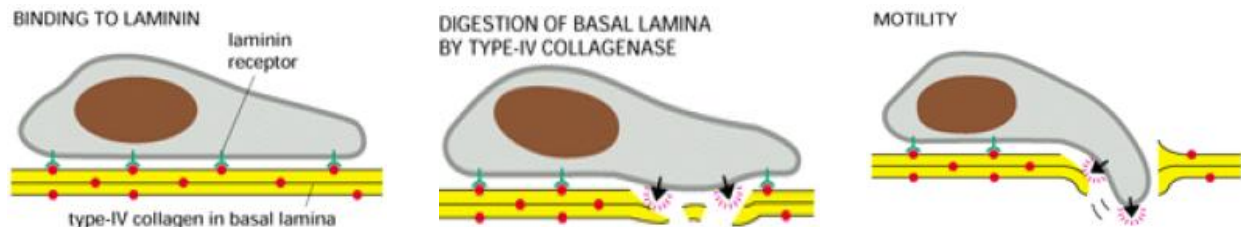
A maior parte dos componentes da lâmina basal são sintetizados por células que nela permanecem. Assim, existem quatro principais componentes que constituem a lâmina basal:

- Colagénio tipo IV
- Laminina
- Perlicano
- Glicoproteínas

⇒ Degradação da lâmina basal

Os processos de degradação da lâmina basal iniciam-se extracelularmente com a disrupção parcial das fibrilas de colagénio por um conjunto de **colagenases** da grande família das metaloproteases da matriz (MMP) dependentes do cálcio e do zinco, sendo completado intracelularmente após fagocitose dos resíduos inicialmente obtidos.

A laminina tem receptores presentes junto ao colagénio tipo IV que vão ser reconhecidos por moléculas presentes na lâmina basal. Devido à presença da collagenase que mantém a estrutura da lâmina basal através da facilitação da migração, a lâmina basal é digerida progressivamente depois da fagocitose dos resíduos. Com este mecanismo, criam-se fendas ao longo da lâmina basal, permitindo a migração das moléculas e a consequente degradação total da lâmina a partir do lado intracelular.



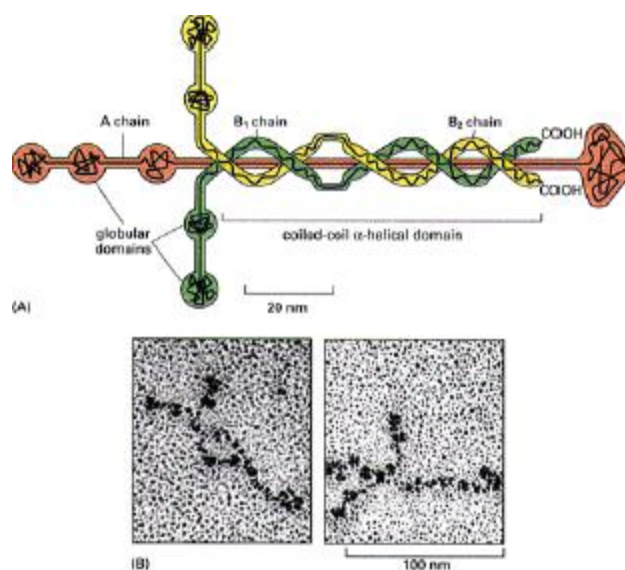
6. Laminina

A laminina é a principal proteína da matriz na lâmina basal, sendo uma proteína heterotrimérica, com elevado peso molecular. Existem várias isoformas de laminina, contendo cadeias polipeptídicas ligeiramente diferentes.

Alguns domínios globulares no terminal C da subunidade α da laminina medeiam as moléculas dependentes de Ca^{2+} e a ligação de hidratos de carbono específicos a moléculas específicas da superfície celular como o sindecano e o distroglicano. Os domínios globulares encontram-se numa grande variedade de proteínas e podem mediar a ligação a esteróides, proteínas e até hidratos de carbono.

Quanto às funções, intervém na:

- ✚ Regulação da passagem de nutrientes;
- ✚ Organização de tecidos;
- ✚ Selectividade do movimento das células.



Capítulo 10 – Comunicação extracelular

Os mecanismos de comunicação celular dependem, basicamente, de moléculas sinalizadoras extracelulares, produzidas pelas células, para sinalizar às suas vizinhas ou às células mais distantes. Eles dependem, também, de sistemas proteicos elaborados existentes nas células que lhes permitem responder, de forma específica, a determinados subgrupos desses sinais.

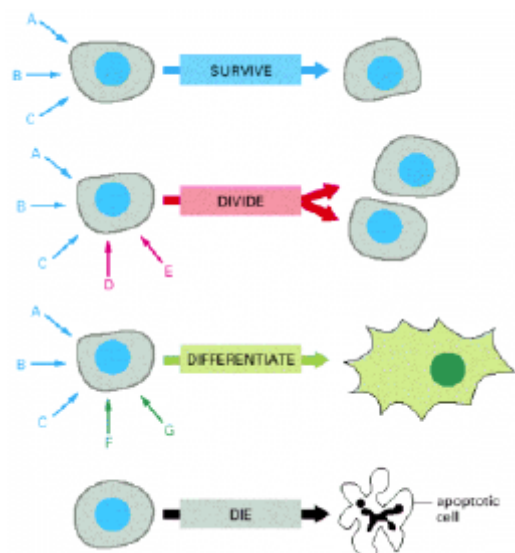
Essas proteínas vão desde receptores de superfície celular que se ligam à molécula sinalizadora até uma variedade de proteínas sinalizadoras intracelulares que distribuem o sinal para regiões adequadas da célula. Entre as proteínas sinalizadoras intracelulares encontram-se quinases, fosfatases, proteínas que se ligam a GTP e muitas outras proteínas com as quais essas interagem. No final de cada uma destas rotas de sinalização encontra-se as proteínas-alvo que são alteradas quando o caminho está activo, mudando o comportamento da célula. Dependendo do efeito, essas proteínas-alvo podem ser reguladoras de genes, de canais iónicos, componentes de uma rota metabólica, de partes do citosqueleto, etc.

Os mecanismos que permite que uma célula exerça influência sobre o comportamento de outra existam, provavelmente, no mundo dos organismos unicelulares muito tempo antes do aparecimento dos organismos pluricelulares.

1. Sinais extracelulares

A maneira específica pela qual a célula reage ao seu ambiente é variável. Ela varia de acordo com o conjunto de proteínas receptoras que a célula possui, o que determina o subgrupo particular de sinais ao qual ela pode responder, o que, por sua vez, varia de acordo com a maquinaria intracelular, por meio da qual a célula integra e interpreta os sinais que recebe.

Cada tipo celular exibe um conjunto de receptores que o torna capaz de responder a um conjunto de moléculas sinalizadoras produzidas por outras células. Estas moléculas regulam o comportamento celular, trabalhando de forma coordenada. Como está exibido na figura, uma célula necessita de múltiplos sinais para sobreviver (setas azuis) e sinais adicionais para se dividir (seta vermelha) ou diferenciar (setas verdes). Se a célula for privada dos sinais de sobrevivência apropriados, ela sofre uma forma de suicídio conhecido por morte celular programada, ou **apoptose**.

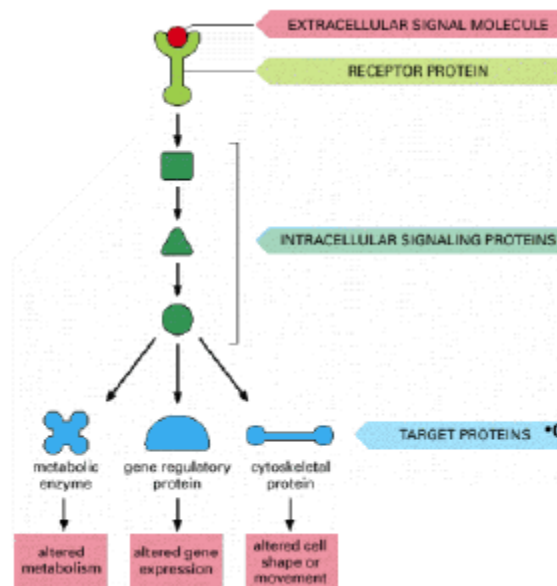


⇒ Ativação da sinalização intracelular

Depois de passar o receptor, vão existir no interior da célula, proteínas que vão desencadear uma série de reacções. As proteínas são as **cinases** que induzem a fosforilação de outras moléculas, as **fosfatases** que desfosforilaram, e **proteínas G** que têm a capacidade de ligar o GTP ou o GDP e são moléculas que são activas em GTP ou inactivas em GDP.

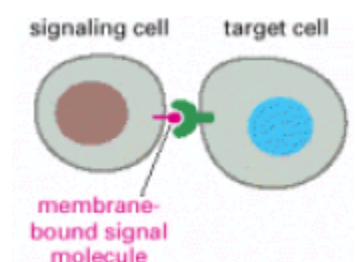
Para além destas proteínas, existem também mensageiros que actuam a vários níveis: nível de proteínas de factores de transcrição, nível de proteínas que intervêm no metabolismo ou podem alterar as proteínas que fazem parte do citosqueleto. Quando se ligam a estas moléculas, alteram a transcrição genética, activando ou reprimindo a expressão de um determinado gene, permitindo a síntese ou não de uma determinada proteína. Ao ligar-se ao citosqueleto, alteram também a forma dessa mesma célula.

A resposta da célula a um sinal extracelular está dependente dos receptores que ela tem. Por outro lado, a via de transdução de sinal, porque existem várias, e quando a molécula se liga ao receptor pode induzir a activação de várias vias e portanto conforme a via activada, existe uma resposta diferente. Consoante a via de activação, os processos intracelulares afectados também vão ser diferentes, logo uma molécula extracelular ao ligar-se ao receptor numa célula, não vai sempre induzir as mesmas respostas do que quando se liga a outra célula → **resposta diferente consoante o tipo de célula.**

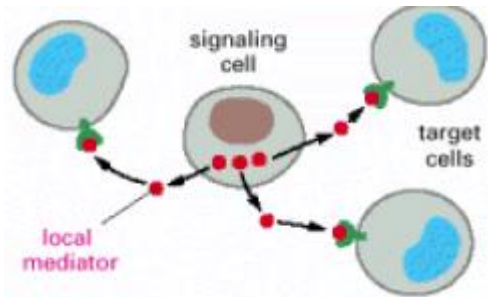


2. Formas de sinalização

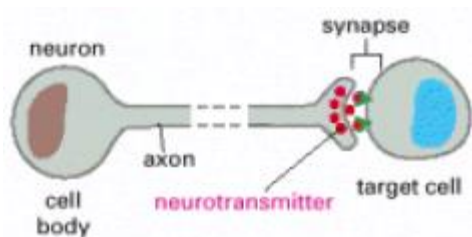
✚ **Sinalização dependente de contacto** – muitas moléculas sinalizadoras permanecem ligadas à superfície das células e influenciam somente células que estabelecem contacto. Esta sinalização é importante, especialmente durante o desenvolvimento e na resposta imunitária.



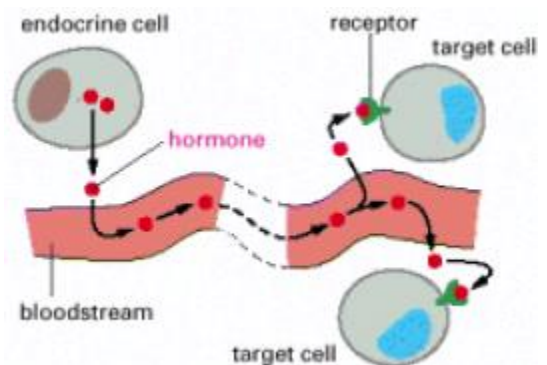
✚ **Sinalização parácrina** – as moléculas sinalizadoras são secretadas e podem ser levadas para longe, actuando em alvos relativamente distantes, ou podem agir como mediadores locais afectando apenas as células que estão muito próximas da célula sinalizadora. Para que os sinais parácrinos possam ser recebidos só pelas células-alvo adequadas, as moléculas secretadas devem ter sua difusão restrita; por isso elas são, com frequência, captadas rapidamente pelas células-alvo das vizinhanças, destruídas por enzimas extracelulares ou imobilizadas pela matriz extracelular.



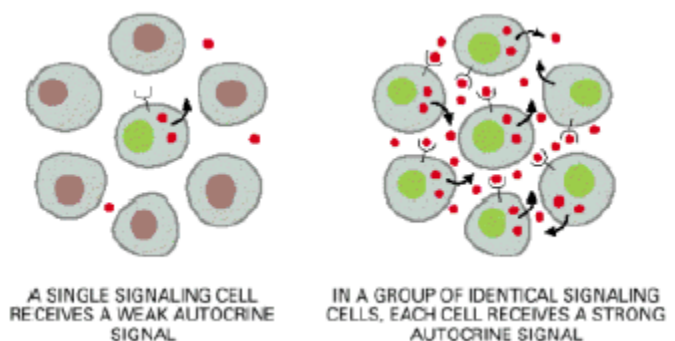
✚ **Sinalização sináptica** – nos organismos multicelulares bastante complexos, os grupos de células especializadas evoluíram com a função específica de estabelecer comunicação entre partes distantes do corpo. As mais sofisticadas são as células nervosas (neurónios), que estendem longos prolongamentos (axónios) que lhes permitem entrar em contacto com células-alvo distantes. Quando activado por sinais do meio ou de outras células, o neurónio envia impulsos eléctricos (potenciais de acção) ao longo do seu axónio; quando um impulso desse tipo chega à extremidade do axónio, promove a secreção pelos terminais nervosos aí localizados, de um sinal químico chamado neurotransmissor. Esses sinais são secretados em junções celulares especializadas, chamadas sinapses químicas, desenhadas de forma a assegurar que o neurotransmissor seja liberado especificamente na célula-alvo pós-sináptica.



✚ **Sinalização endócrina** - uma célula sintetiza uma determinada substância que tem de passar a corrente sanguínea e só depois é que vai actuar em células-alvo que estão muito distantes. Se umas moléculas são sintetizadas e passam a corrente, vai haver diminuição das substâncias, provocando uma resposta demorada, porque se sintetiza uma molécula numa parte, para só mais tarde vir a actuar.

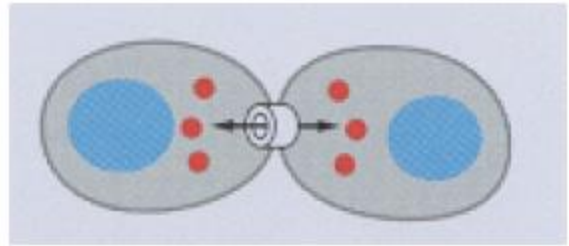


✚ **Sinalização autócrina** – as células podem enviar sinais para outras células do mesmo tipo, assim como para elas mesmas. Nesta sinalização, uma célula secreta moléculas sinalizadoras que se ligam aos seus receptores na própria célula. Durante o desenvolvimento, por exemplo, quando uma célula decide seguir uma determinada rota de diferenciação, ela começa a secretar sinais autócrinos, o que reforça a sua



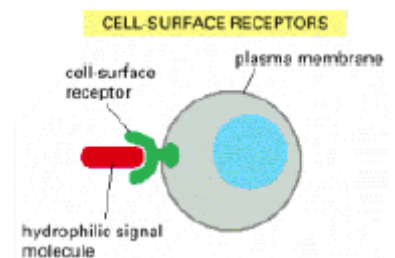
decisão anterior. A sinalização autócrina é mais efectiva quando realizada, simultaneamente, por células vizinhas do mesmo tipo, e parece ser usada para encorajar grupos de células idênticas a tomar os mesmos caminhos ao longo do desenvolvimento. Assim, a sinalização autócrina é o possível mecanismo responsável pelo “efeito comunidade” observado nos estágios precoces do desenvolvimento, durante o qual um grupo de células idênticas responde a um sinal indutor de diferenciação, enquanto uma célula isolada do mesmo tipo não responde.

Sinalização das junções comunicantes – as junções comunicantes nas células de um embrião em desenvolvimento são feitas e desfeitas em padrões específicos e interessantes, sugerindo, fortemente, que elas desempenham um papel importante nos processos de sinalização que ocorrem entre essas células. Da mesma forma que na sinalização autócrina, a comunicação por junções comunicantes auxilia na coordenação do comportamento de células similares adjacentes. Contudo, ainda não se sabe quais as pequenas moléculas importantes que actuam como transportadoras de sinais deste tipo, bem como não se conhecem as funções específicas da comunicação, através dessas junções, no desenvolvimento animal. Assim, em suma, as células conectadas por junções comunicantes compartilham pequenas moléculas, inclusive pequenas moléculas sinalizadoras intracelulares, podendo assim, responder a sinais extracelulares de maneira coordenada.

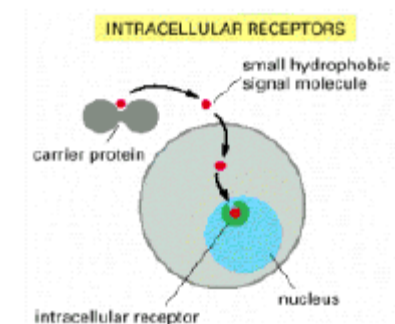


3. Tipos de receptores

Na maioria dos casos, as moléculas sinalizadoras são hidrofílicas e os receptores são proteínas transmembranares na **superfície** da célula-alvo. Ao ligarem-se a uma molécula sinalizadora extracelular, esses receptores são activados e geram uma cascata de sinais intracelulares, que alteram o comportamento da célula.



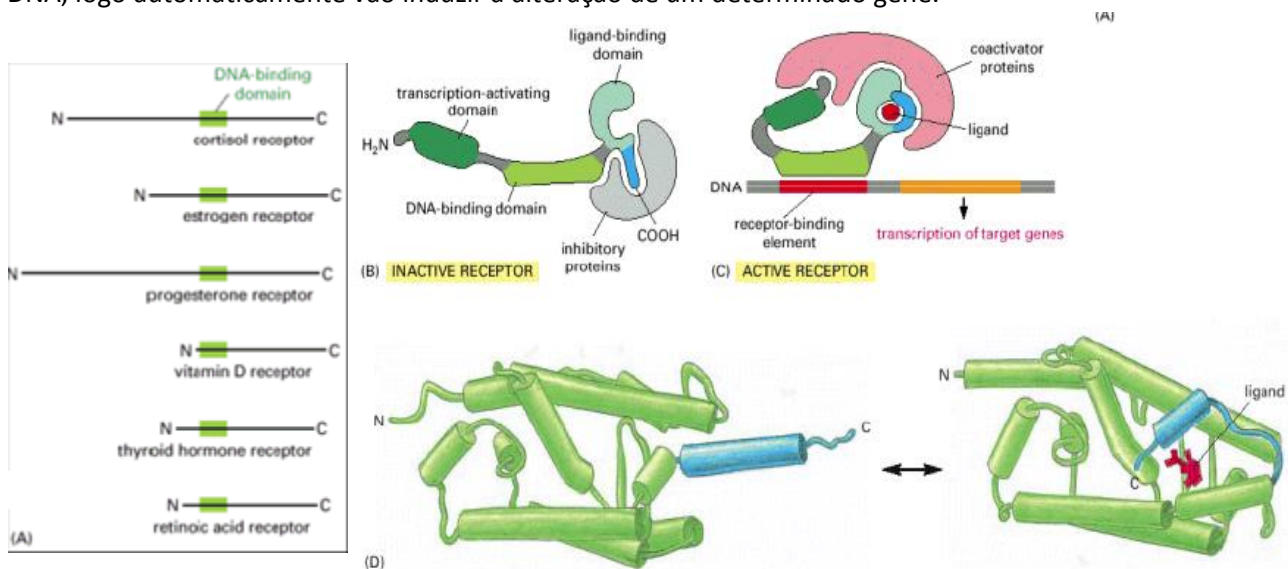
Em outros casos, os receptores são **intracelulares**, e a molécula sinalizadora tem que penetrar na célula-alvo para activá-los, sendo que isso requer que ela seja suficientemente pequena e hidrofóbica para que se possa difundir através da membrana plasmática.



⇒ Superfamília dos receptores nucleares

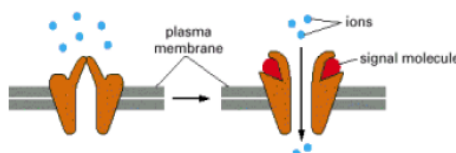
Estes receptores existem na célula sob a forma inactiva associados a outras moléculas que vão impedir que os receptores funcionem. Quando os receptores estão no citosol, tornam-se activos após a ligação da molécula de sinalização extracelular que se liga ao receptor, o inibidor desliga-se. Assim, o receptor pode passar ao núcleo, ligar-se ao DNA e induzir a expressão ou repressão de um determinado gene. No caso de existirem receptores nucleares, tornam-se activos quando existem no núcleo ligados ao DNA e quando a molécula de sinalização extracelular se liga ao receptor, induzindo também a expressão ou repressão do gene.

As moléculas capazes de induzir este tipo de resposta são moléculas que se ligam quer aos receptores citosólicos quer aos nucleares, e são sempre hidrofóbicas. São as hormonas esteróides (cortisol, ou hormonas sexuais), vitamina D, hormonas da tiróide (provêm de um aminoácido que é a tirosina) e os retinóides. No caso das tiróides e dos retinóides ligam-se a receptores nucleares que já estão associados a DNA, logo automaticamente vão induzir a alteração de um determinado gene.

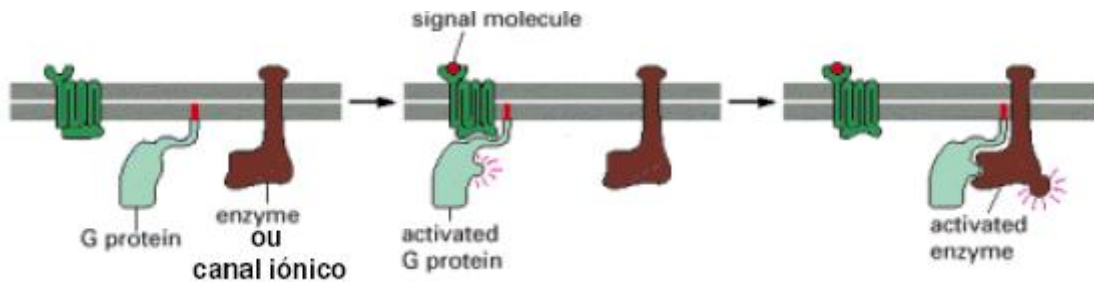


4. Tipos de receptores de superfície

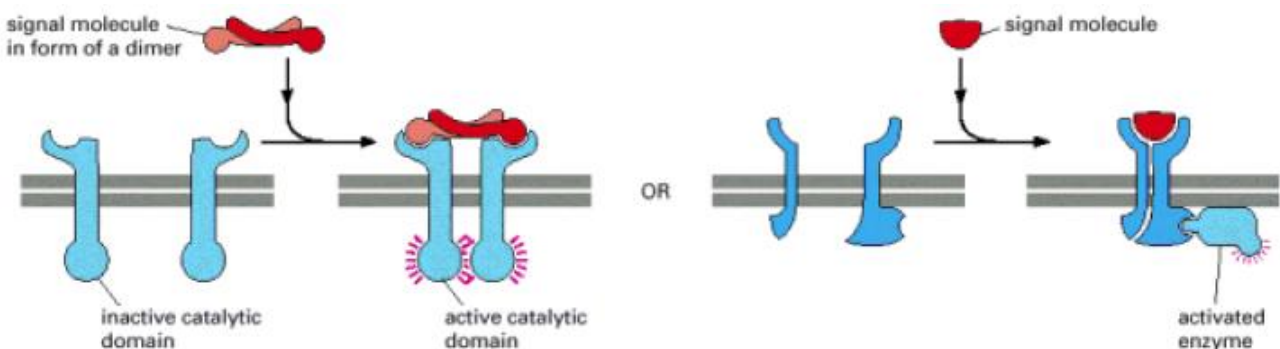
Receptores associados a canais iónicos – estão envolvidos na sinalização sináptica rápida entre células electricamente excitáveis. Esse tipo de sinalização é mediado por um pequeno número de neurotransmissores que abrem ou fecham, temporariamente, um canal iónico formado pela proteína à qual se ligam, alterando por um período curto, a permeabilidade da membrana plasmática aos iões e, dessa forma, a excitabilidade da célula pós-sináptica. Os receptores associados a canais iónicos pertencem à grande família das proteínas transmembranares multipasso.



✚ **Receptores associados à proteína G** – actuam indirectamente na regulação da actividade de uma proteína-alvo ligada à membrana plasmática, que pode ser tanto uma enzima como um canal iónico. A interacção entre o receptor e a proteína-alvo é mediada por uma terceira proteína, chamada proteína trimérica ligante de GTP (Proteína G). A activação da proteína-alvo altera a conformação de um ou de mais mediadores intracelulares (se a proteína-alvo for um canal iónico). Os mediadores intracelulares afectados, por sua vez, alteram o comportamento de outras proteínas de sinalização na célula. Todos os receptores de ligação à proteína G pertencem à grande família das proteínas homólogas transmembranares de sete passos.



✚ **Receptores associados a enzimas** – quando activados, funcionam directamente como enzimas, ou estão associados directamente a enzimas activadas por eles. São formados por proteínas transmembranares unipasso, cujo sítio de interacção com o ligante está do lado de fora da célula e cujo sítio catalítico, ou de ligação à enzima, do lado de dentro. Esses receptores apresentam uma estrutura heterogénea em comparação com as outras duas classes. A grande maioria, contudo, é representada por cinases ou é associada com cinases e, quando activada, induz a fosforilação de grupos específicos de proteínas nas células-alvo.



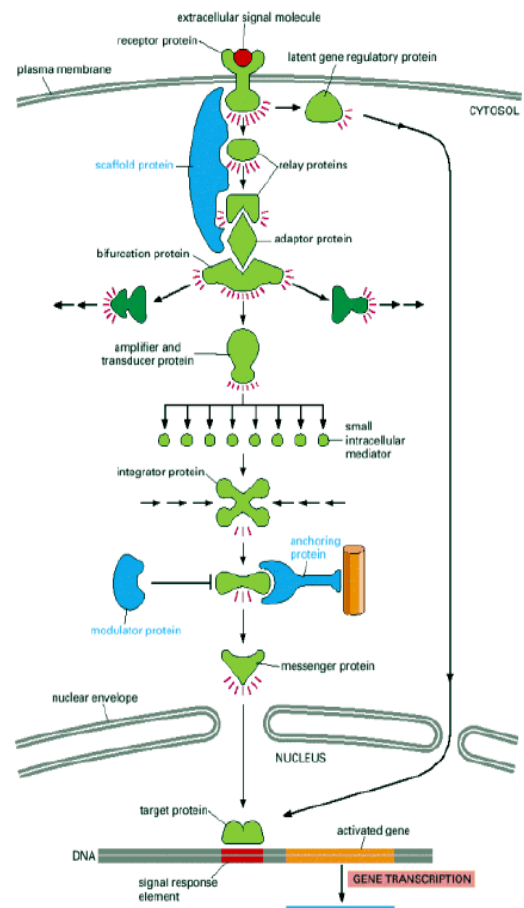
5. Sinalização intracelular

Os sinais recebidos por receptores associados à proteína G ou associados a enzimas, na superfície de uma célula, são transmitidos para o seu interior por uma combinação de moléculas de sinalização intracelular. A cadeia de eventos de sinalização intracelular resultante altera proteínas-alvo que serão responsáveis pela modificação do comportamento da célula.

As proteínas de sinalização intracelular são as proteínas de sinalização intracelular. Muitas delas transmitem o sinal para dentro da célula activando a proteína sinalizadora seguinte na cadeia ou gerando

pequenos mediadores intracelulares. Essas proteínas podem ser classificadas de acordo com a sua função particular, embora muitas se possam inserir em mais de uma das seguintes categorias:

- ✚ **Proteínas transmissoras** – simplesmente passam a mensagem para o próximo componente da cadeia de sinalização.
- ✚ **Proteínas mensageiras** – carregam o sinal de uma parte da célula para outra, por exemplo, do citosol para o núcleo.
- ✚ **Proteínas adaptadoras** – conectam proteínas sinalizadoras.
- ✚ **Proteínas amplificadoras** – geralmente, são enzimas ou canais iônicos, intensificam o sinal recebido por meio da produção de grande quantidade de mediadores intracelulares pequenos ou pela activação de um grande número de proteínas sinalizadoras a jusante. Uma cadeia de transmissão com múltiplas etapas de amplificação é, frequentemente, conhecida como cascata de sinalização.
- ✚ **Proteínas transdutoras** – alteram a forma do sinal. A enzima que produz AMPc é um exemplo, ao converter e amplificar o sinal, actuando tanto como transdutora como amplificadora.
- ✚ **Proteínas de bifurcação** – propagam o sinal de uma rota de sinalização para outra.
- ✚ **Proteínas integradoras** – recebem sinais de duas ou mais rotas sinalizadoras e integram-nos antes de transmiti-los mais à frente.
- ✚ **Proteínas reguladoras de genes latentes** – são activadas na superfície celular por receptores activos e migram para o núcleo, onde estimulam a transcrição génica.



Outros tipos de proteínas intracelulares também desempenham papéis importantes na sinalização intracelular, como está mostrado, a azul, na figura. As **proteínas moduladoras** modificam a actividade de proteínas sinalizadoras intracelulares, regulando a intensidade ao longo de uma determinada rota de sinalização. As **proteínas de ancoramento** mantêm determinadas proteínas sinalizadoras numa localização precisa da célula através da sua fixação à membrana ou ao citosqueleto. Por fim as **proteínas de suporte** são proteínas adaptadoras e/ou de ancoramento que unem proteínas sinalizadoras múltiplas em um complexo funcional e, comumente, as mantêm em uma localização específica.

⇒ **Proteínas de sinalização intracelular**

Geralmente, são proteínas ou mensageiros secundários. As proteínas são as cinases, as fosfatases ou as proteínas G.

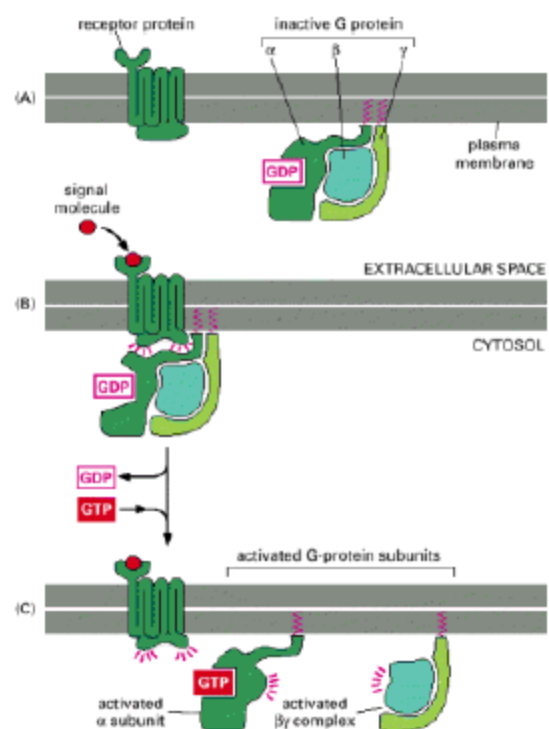
✚ **Proteínas G** – são GTPases, estando activas quando ligadas a GTP e inactivas quando ligadas a GDP. Para se tornarem activas ou inactivas, é necessária a intervenção de outras proteínas como o **GEF** que transforma o GDP em GTP e o **Gap** que tem a capacidade de hidrolisar o GTP a GDP. Estas proteínas G são activas após ligação ao receptor da membrana. Em primeiro lugar, estas proteínas são diferentes porque são triméricas, tendo três unidades: α , β e γ . Quando se dá a ligação da molécula extracelular ao receptor, este vai induzir a activação da proteína G, através da intervenção do GEF, para que haja a passagem de GDP a GTP. Com isto, a única subunidade ligada ao GDP passa a ser a α . Assim, esta vai-se ligar ao receptor e vai haver a transferência de GDP a GTP na subunidade α , havendo alteração da conformação, e havendo dissociação das restantes subunidades.

✚ **Cinases e fosfatases** – as cinases vão fosforilar determinados aminoácidos como a timosina, a serina ou a treonina, existindo vários tipos. O receptor pode apresentar actividade cinásica ou fosfatásica, induzindo a fosforilação ou desfosforilação da molécula. O receptor pode interagir com cinases citosólicas ou membranares e a actividade catalítica da cinase pode ser regulada pelas próprias cinases, provocando a alteração do nível de segundos mensageiros.

✚ **Segundos Mensageiros** – cálcio, AMP cíclico, 1,2-diacilglicerol, inositol-trifosfato. O cálcio, por exemplo, existe em baixas concentrações no citosol, sendo que estas baixas concentrações são mantidas através de bombas de cálcio na membrana plasmática, na membrana mitocondrial ou na membrana do retículo endoplasmático.

⇒ **Activação das proteínas G**

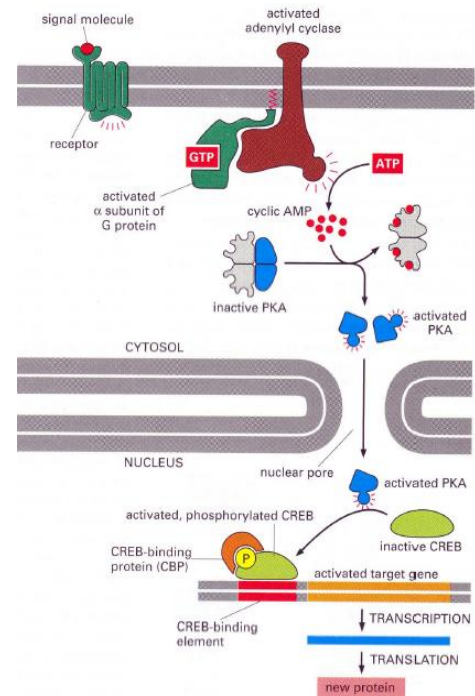
No estado não-estimulado, o receptor e a proteína G estão inactivos. Embora estejam mostrados na imagem como entidades separadas na membrana plasmática, em alguns casos, pelo menos, estão associados num complexo pré-formado. A ligação de um sinal extracelular ao receptor altera a conformação deste que, por sua vez, altera a conformação da proteína G associada a ele. A alteração da subunidade α da proteína G permite a troca do seu GDP por GTP. Isso provoca a sua dissociação em dois componentes activos – uma subunidade α e um complexo $\beta\gamma$, podendo, ambos, regular a actividade de proteínas-alvo na membrana plasmática. O receptor permanece activo enquanto o sinal externo estiver ligado a ele, podendo, por isso, catalisar a activação de muitas moléculas de proteína G.



6. Via de transdução do AMPc

Quando a célula recebe um estímulo, a concentração de AMPc aumenta numa resposta muito rápida. A molécula extracelular liga-se ao receptor que se liga às proteínas G, e a subunidade α fica activada, induzindo a consequente activação da **adenilciclase** (enzima que tem a capacidade de formar AMPc a partir de ATP).

Estas pequenas moléculas têm a capacidade de se ligar a inibidores que são a **PKA** (proteína-cinase A) que existe sob a forma inactiva no citosol mas quando há produção do AMPc tem a capacidade de se ligar ao inibidor, este desliga-se e a PKA torna-se activa, fosforilando vários substratos. Depois disto, o substrato fosforilado pode-se ligar ao DNA, induzindo a activação ou repressão dos genes. Entre a ligação do AMPc ao inibidor e a transcrição dos genes, há uma grande quantidade de moléculas (que não estudamos) que vão intervir.

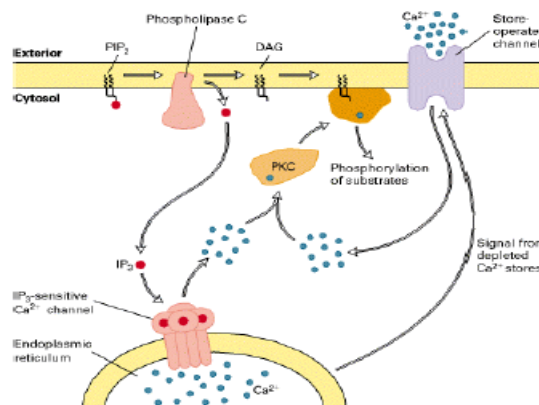


7. Via de transdução do IP3/DAG

Esta via de transdução pode ser comandada através do ligando de ligação dos receptores da proteína-G e de outros receptores variados, tendo como objectivo a activação da fosfolipase C. A clivagem do PIP_2 pela fosfolipase C conduz à formação do IP_3 e do DAG.

Depois da difusão através do citosol, o IP_3 interage com o Ca^{2+} e abre os seus canais na membrana do retículo endoplasmático, provocando a libertação dos iões Ca^{2+} para o citosol. Uma das respostas celulares induzida pela ascensão do Ca^{2+} citosólico é o recrutamento da proteína-cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde é activada pelo DAG.

A PKC activa pode fosforilar várias enzimas e receptores celulares e ainda alterar algumas das suas actividades. Desta forma, tal como o Ca^{2+} do retículo endoplasmático é esgotado, os canais de Ca^{2+} comandados pelo IP_3 ligam-se e abrem os canais de Ca^{2+} do TRP na membrana plasmática, permitindo o fluxo de Ca^{2+} extracelular para o interior da célula.



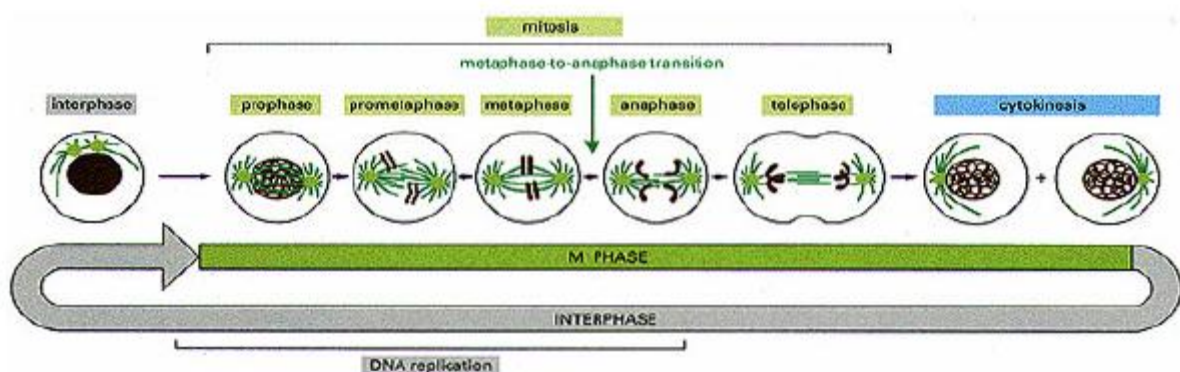
Capítulo 11 – Ciclo celular

A noção de **ciclo celular**, tempo compreendido entre a mitose de uma célula e a mitose seguinte de uma ou duas células filhas, trouxe uma nova dimensão ao estudo da proliferação e da diferenciação das células. A capacidade de reprodução ou proliferação é uma característica fundamental das células indiferenciadas. A proliferação celular normal é regulada de forma a que a produção de novas células compense, exactamente, a perda de células pelos tecidos.

A maioria dos tecidos de um organismo adulto, com excepção do tecido muscular e do tecido nervoso, possui um compartimento de células indiferenciadas susceptíveis de se dividirem, originando, por mitose, células filhas com as mesmas características morfológicas, fisiológicas e genéticas da célula que lhes deu origem. Tornou-se aparente, depois da descoberta do ciclo celular, que todas as células, quer *in vitro* quer *in vivo* duplicam o seu DNA antes da divisão mitótica. A fase de síntese do DNA (fase S) e a mitose (fase M), ambas distintas, permitem estabelecer um pequeno intervalo (*gap*) entre o fim da mitose e o início da fase da síntese – fase G1 – e um segundo intervalo entre o fim da fase de síntese e o começo da mitose – fase G2.

A noção fundamental, obtida a partir da descoberta do ciclo celular, é a da existência da fase de síntese do DNA num tempo bem determinado no ciclo, no meio da interfase. Na interfase, os cromossomas não são visíveis e verifica-se crescimento celular à custa da síntese de proteínas, ribossomas e retículo granular. As células saem do ciclo celular quando iniciam a sua diferenciação e maturação, logo a interfase inclui todo o tempo do ciclo celular compreendido entre duas mitoses sucessivas, que corresponde a cerca de 90% da duração do ciclo. A seguir à mitose de uma célula, as células-filhas podem seguir três vias alternativas:

- ✚ Um processo que conduz à diferenciação e à maturação, tornando-se células não proliferativas, saindo do ciclo de divisão e migrando para camadas mais superficiais (caso dos epitélios) ou diversos compartimentos celulares (caso das células sanguíneas);
- ✚ Ou iniciarem nova fase de síntese após uma fase pós-mitótica de duração normal;
- ✚ Ou ainda, entrarem numa fase pós-mitótica prolongada, reentrando, mais tarde, em nova fase de síntese do DNA e cumprindo outro ou mais ciclos de divisão.



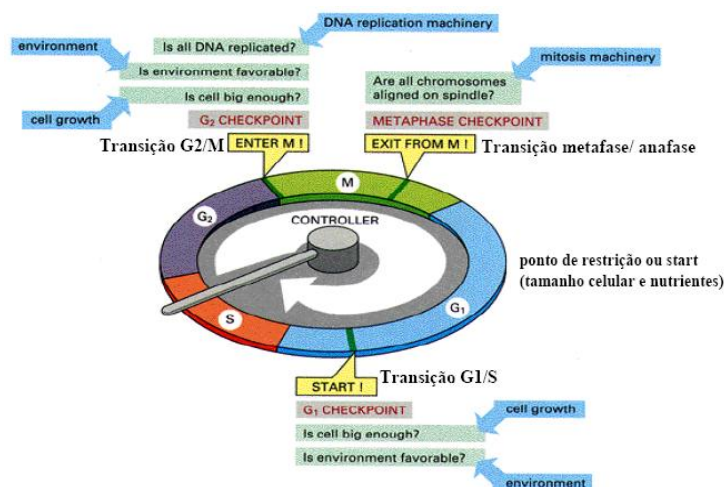
1. Controlo do ciclo celular

A maneira específica pela qual a célula reage ao seu ambiente é variável. Ela varia de acordo com o conjunto de proteínas receptoras que a célula possui, o que determina o subgrupo particular de sinais ao qual ela pode responder, o que, por sua vez, varia de acordo com a maquinaria intracelular, por meio da qual a célula integra e interpreta os sinais que recebe.

1.1. Pontos de contacto do ciclo celular

Na fase G₁, existem dois pontos de controlo. O primeiro é o **ponto de restrição** ou *start*, em que as células caso tenham os nutrientes necessários, podem continuar, senão ficam interrompidas na fase G₀. Depois de passar o ponto de restrição para a fase S, a célula tem de apresentar tamanho suficiente e um ambiente favorável para se dar a síntese de todas as moléculas de DNA, para que mais tarde já na fase S ocorra a replicação do DNA e a passagem da célula para a fase G₂.

Para passar à fase M, a molécula de DNA tem de estar completamente replicada (maquinaria de replicação do DNA) e para além disso, têm de existir condições ambientais favoráveis (proteínas e factores de crescimento) e a célula tem de ter crescido o suficiente para ocorrer a síntese de proteínas. Caso todos estes requisitos sejam completos, a célula pode passar à mitose.



1.2. Reguladores do ciclo celular

✚ **Ciclins** – variam ao longo do ciclo celular, tendo um ciclo de vida e sendo sintetizadas e degradadas. Existem vários tipos:

- G₁/S – necessárias para a preparação da replicação do DNA
- S – necessárias para o início da replicação do DNA (não intervêm directamente, mas permitem que o processo ocorra)

- **M** – promovem a mitose, sendo importantes para a reorganização do citosqueleto quando a forma da célula é alterada, do Complexo de Golgi e do retículo endoplasmático. Permitem que a célula mantenha a sua constituição, de forma a que na célula possa originar a divisão nuclear.

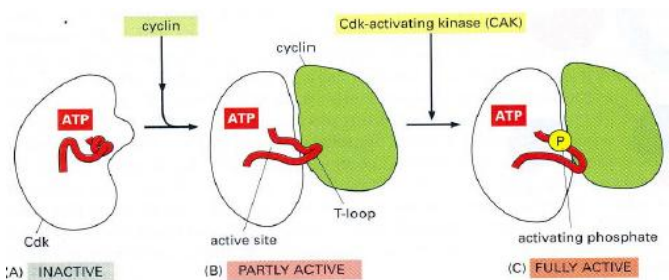
- **G1** – promovem a passagem da célula através do ponto de restrição G1.

- **CDKs** – fosforilam, sendo cinases e dependentes das ciclinas. Existem sempre na mesma concentração ao longo do ciclo, mas sendo dependentes das ciclinas, tanto estão activas como inactivas. Levam a oscilações cíclicas na fosforilação de proteínas que iniciam ou regulam a replicação de DNA, mitose e citocinese.

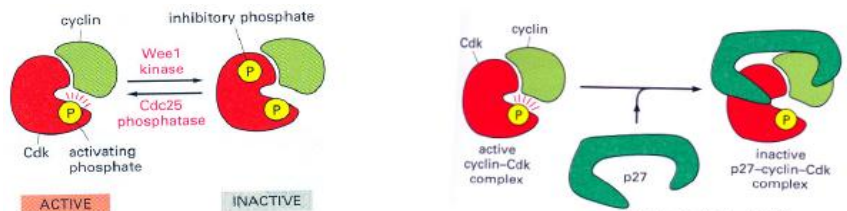
- **CKIs** – inibidores das CDKs, fazendo com que elas não tenham actividade quando ficam ligados.

⇒ Regulação das CDKs

- **Activação** – a ligação da ciclina independente provoca uma activação parcial das CDKs, mas a activação completa requer a intervenção do CAK para ocorrer a fosforilação do complexo final. Em células animais, o CAK (CDK-activating kinase) fosforila a subunidade do CDK depois da ligação da ciclina, num determinado local específico. Com isto, o complexo CDK-ciclina forma-se através de um grupo fosfato activo que se localiza na subunidade, conferindo completa activação à CDK.

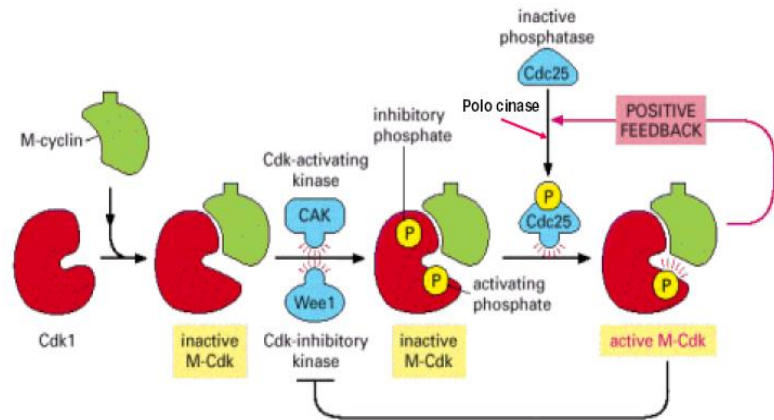


- **Inactivação** – em células proliferativas activas, a maior parte da actividade das CDKs é suprimida durante a fase G1, resultando numa transição estável durante a qual o crescimento celular e outros factores de regulação celular podem comandar a entrada num novo ciclo. Na inibição das CDKs intervêm um grupo de proteínas, as CKIs (CDK-inhibitor proteins) que se ligam a elas e inactivam o complexo CDK-ciclina, sendo que esta inibição pode ocorrer de duas formas distintas: utilizando os CKIs, em que as ciclinas ao estarem associadas à CDK e têm a fosforilação de um aminoácido necessário, a proteína activa pode sofrer inactivação se se ligar a uma CKI. Em determinadas situações é necessário degradar os CKIs por ubiquitinação. No outro caso de inibição, a proteína que está activa tem uma fosforilação, através de uma cinase sofre outra fosforilação e, conseqüentemente, torna-se inactiva.



⇒ Ativação das mCDKs

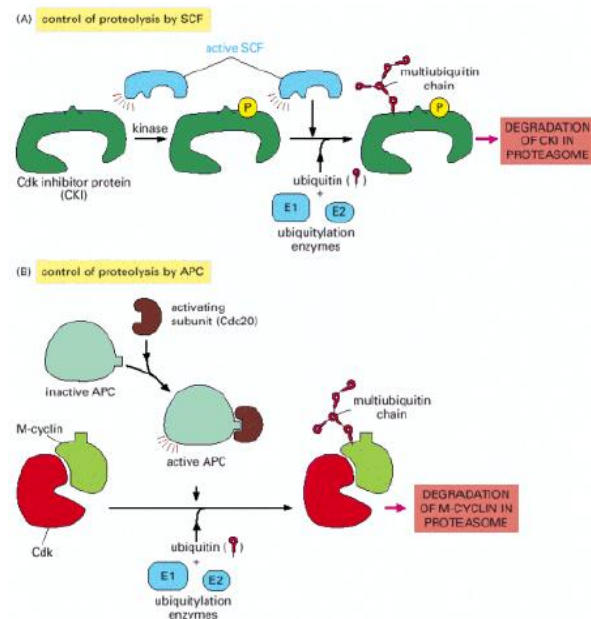
A CDK1 liga-se a M-ciclina, mas mesmo assim continua inactiva, tendo necessidade de sofrer fosforilações, para só depois sofrer uma desfosforilação e passar a activa. Por acção da CAK, sofre uma fosforilação e através da enzima Wee1 que é uma cinase, o complexo sofre outra fosforilação → o complexo sofre 2 fosforilações por acção de 2 enzimas diferentes.



Para se tornar activa, necessita de sofrer uma desfosforilação, por acção de uma fosfatase q é a Cdc25. A Cdc25 é uma fosfatase que existe na célula sob a forma inactiva, e quando a célula necesssita, existe uma cinase (polo cinase) que vai permitir que a Cdc25 sofra uma fosforilação. Ao sofrer fosforilação, a Cdc25 torna-se activa, actua como fosfatase e o complexo (M-CDK) torna-se activo. No entanto, o complexo activo tem um efeito de sobre a Cdc25 inactiva, pois tem a capacidade de induzir a sua fosforilação e, por outro lado, o complexo ainda tem a capacidade de inibir a Wee1.

⇒ Ubiquitinação das ciclinas ou CKIs

Os CKIs são moléculas com capacidade de inibir CDKs, mas em determinadas alturas precisam de ser degradados. A **proteína SCF** tem a capacidade de induzir a fosforilação dos CKIs e, com isto, permitir que as moléculas sejam reconhecidas como moléculas a degradar. Assim, o sinal é a fosforilação, e vai haver a ligação de várias moléculas de ubiquitina. A proteína sofre fosforilação e, portanto permite, através de várias enzimas, a ligação da ubiquitina, sendo degradada por um complexo enzimático, o proteossoma.

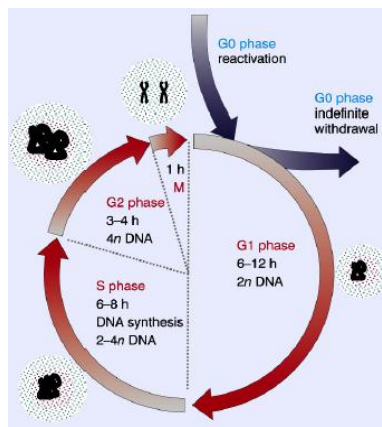


Existe ainda um complexo, o **APC**, que tem de se tornar activo para que as células em metafase passem para a anafase. Se o complexo não for activo, a célula fica parada em metafase, não havendo possibilidade de avançar na mitose. O APC inactivo liga-se a uma Cdc e com isto vai tornar-se activo, funcionando como uma enzima que permite a ligação da ubiquitina as moléculas que devem ser degradadas. Desta forma, o APC activo vai funcionar como uma ubiquitina-ligase e para além dele, também intervêm outras enzimas neste processo. Por fim, o APC activo vai permitir a ligação da ubiquitina às ciclinas, formando um sinal que indica a degradação da molécula por ubiquitinação.

2. Interfase

A vida de uma célula começa, no momento em que a divisão celular que a originou acaba e o momento em que ela mesma se divide ou morre, ou seja, toda a actividade celular cessa. A interfase corresponde ao período entre o final de uma divisão celular e o início da segunda.

Geralmente, a célula encontra-se nesta fase a maior parte da sua vida (cerca de 90%) e durante esta fase, o DNA não é visível ao microscópio óptico. A interfase é constituída por três fases: G1, S e G2. No entanto, existe um estado estacionário ou fase G0, onde a célula pode permanecer durante meses ou anos, quando têm carência de nutrientes, inibidores da síntese proteica ou uma população supersaturada de células junto a si.



2.1. Fase G1

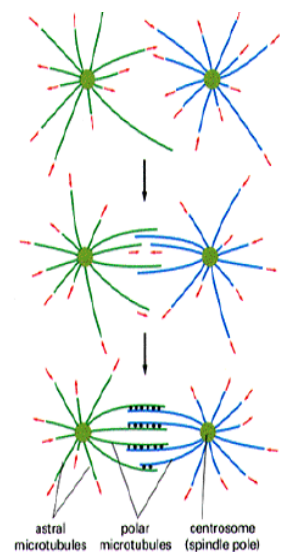
A fase G1 é um período da interfase que se localiza antes da fase S. Para várias células, esta fase inclui o maior período de crescimento e diferenciação celular durante o seu período de vida. Durante esta fase, muitos dos organelos celulares são sintetizados, fazendo com que a célula precise de enzimas e de proteínas estruturais, que também vão contribuir para uma grande síntese proteica.

No final desta fase, ocorre a separação dos centríolos e para a célula completar a fase G1 tem de passar o ponto de restrição antes do início da fase S.

2.2. Fase S

A fase S, ou fase de síntese, é um período do ciclo celular durante a interfase, entre as fases G1 e G2. Depois da fase G1, a célula entra na fase S onde ocorre a síntese e a replicação do DNA. No início da fase S, cada cromossoma é constituído por uma molécula de DNA de dupla hélice, ou seja, por um cromatídeo. Por sua vez, no final da fase, cada cromossoma vai apresentar duas moléculas de DNA com dupla hélice e, portanto, dois cromatídeos-irmãos. Para além disso, o centrossoma também é duplicado, e estes dois eventos apesar de independentes, requerem vários factores comuns para se processarem.

O resultado final é a presença de material genético duplicado na célula, que eventualmente será dividido em duas partes. Por fim, nesta fase, há a síntese

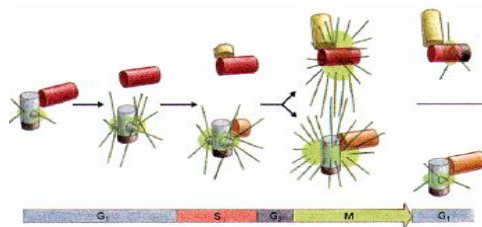


de histonas. Os danos do DNA podem, frequentemente, ocorrer nesta fase, sendo que a sua reparação é iniciada imediatamente depois da replicação.

O **centrossoma** actua como centro organizador de microtúbulos, sendo formado por material amorfo e um par de centríolos. O **aster** é um conjunto radial de microtúbulos, que saem de um pólo do fuso mitótico ou do centrossoma.

⇒ Ciclo centrossómico

O ciclo centrossómico inclui a separação do par de centríolos na fase G1 e a duplicação do centrossoma na fase S, visto este ser necessário para a formação dos pólos do fuso. Na mitose, cada par de centríolos faz parte de um centro organizador microtubular que inicia a formação dos microtúbulos formando um aster. Para esta duplicação do centrossoma, intervém ainda a CDK G1/S.



2.3. Fase G2

A fase G2 é a terceira e final subfase da interfase do ciclo celular. Segue a completção da síntese do DNA e a replicação dos cromossomas da fase S, e ocorre durante um período de tempo bem determinado que compreende cerca de 4 a 5 horas. Nesta fase da interfase, o núcleo fica bem definido, recoberto pelo envelope nuclear e contém pelo menos um nucléolo.

Ainda que os cromossomas tenham sido replicados, elas ainda não podem ser distinguidos individualmente pois ainda se assemelham a pequenos agrupamentos de cromatina condensada. Esta fase prepara a célula para a mitose (fase M) depois de verificar a replicação do DNA, a presença de mutações no DNA e de activar o MPF.

3. Mitose

A mitose é um fenómeno celular que ocorre em diversos tipos de células, nas quais, por um complicado processo de divisão nuclear e citoplasmática, uma célula origina **duas células filhas**. Estas são geneticamente iguais à célula-mãe que lhe deu origem, mantendo-se inalterável o número de cromossomas específicos ($2n \rightarrow 2n$). É um processo de divisão celular em que a perpetuação do genoma celular se mantém inalterável ao longo das diferentes gerações pós-mitóticas.

Durante a mitose, ocorre, como mais adiante está pormenorizado, um conjunto complexo de fenómenos biológicos que se desenvolvem sucessivamente ao longo do processo. Enquanto que uns

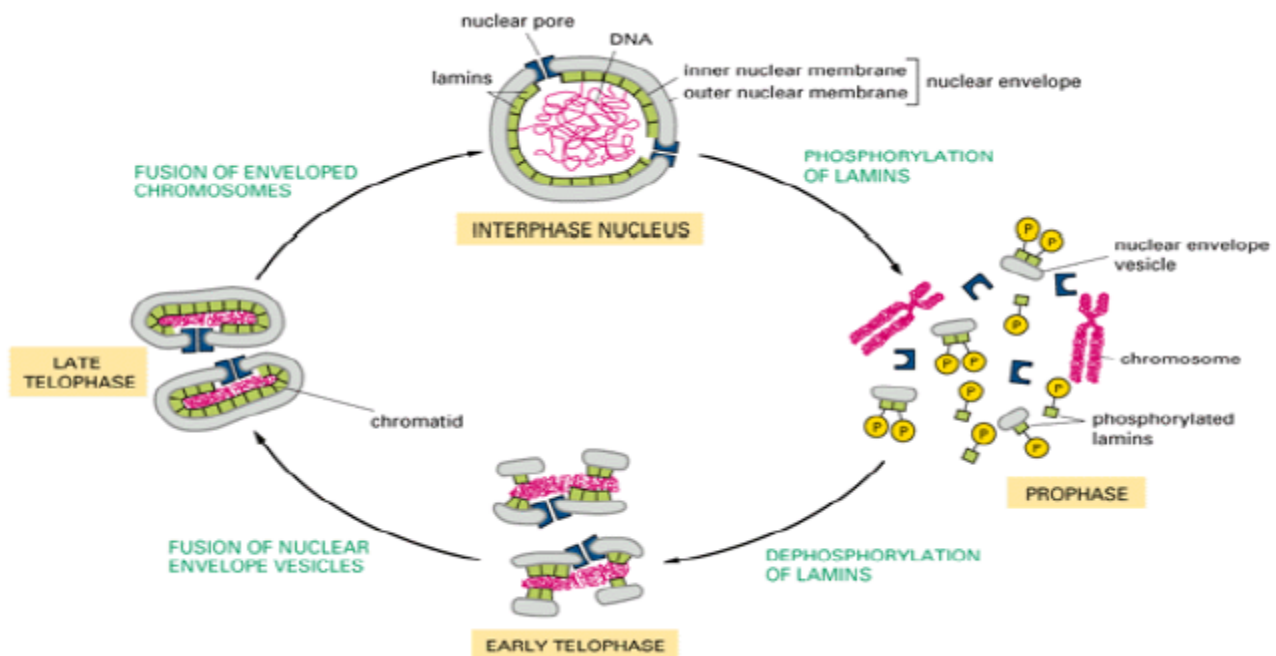
ocorrem simultaneamente, outros ocorrem interligados e dependentes de ocorrências anteriores onde actuam múltiplos factores reguladores do processo.

A quantidade de células que, nomesmo tecido, se encontram simultaneamente em mitose é calculada sob a forma percentual e chama-se **índice mitótico**. O índice mitótico apresenta uma percentagem muito elevada nos ápices vegetativos da raiz e do caule das plantas, bem como no testículo e no ovário dos animais, locais onde se produzem, por mitoses, respectivamente, as várias gerações de espermatogónias e oogónias.

O **centrómero** é o ponto de união dos cromátídeos-irmãos e contém uma sequência de DNA específica necessária para a separação dos cromátídeos-irmãos. Por sua vez, o **cinetocoro** é uma estrutura proteica adjacente ao centrómero onde se ligam os microtúbulos cinetocorianos.

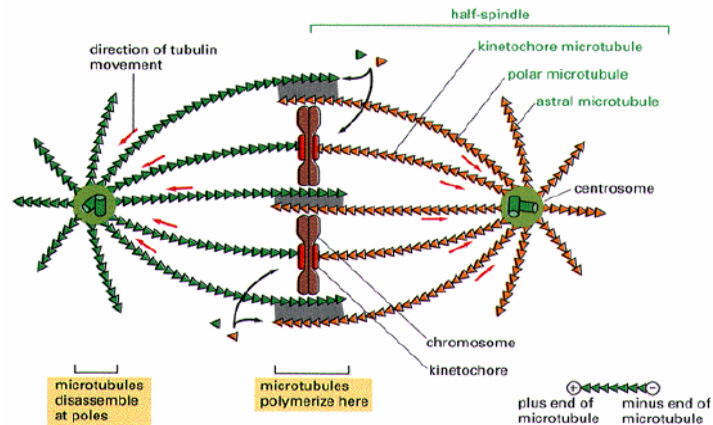
3.1. Alterações do invólucro nuclear ao longo do ciclo celular

Ao longo do ciclo celular, é necessário desaparecer o invólucro nuclear, e isso vai ocorrer através do MPF que tem a capacidade de fosforilar as proteínas constituintes da lâmina nuclear – constituída por filamentos intermédios altamente organizados, que têm composição variável. A lâmina nuclear, ao sofrer fosforilação, sofre desorganização e há alteração da membrana do invólucro nuclear e consequente desintegração da mesma. No início da profase, as lâminas sofrem fosforilação e desintegração e só depois na telofase é que a proteína sofre desfosforilação, permitindo que haja novamente a formação do invólucro nuclear.



Na profase também começa a formação do fuso acromático, constituído por vários tipos de microtúbulos:

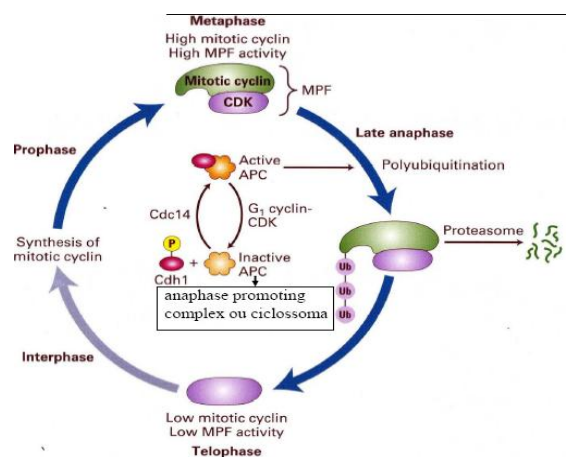
- ✚ Aster – que partem dos centros organizadores microtubulares
- ✚ Cinetocorianos – ligam-se ao cinetocoro
- ✚ Polares – ligam-se a um microtúbulo polar, sendo importante para o movimento dos cromossomas.



3.2. Regulação dos níveis de ciclina

No final da anáfase, o APC (*anaphase-promoting complex*) poliubiquitina as ciclinas mitóticas. À medida que as ciclinas são degradadas por proteossomas, a actividade da cinase MPF diminui abruptamente, desencadeando o início da telófase. A actividade do APC é automaticamente virada para as ciclinas mitóticas através de um factor específico – Cdh1 – que é fosforilado e de seguida inativado pelo complexo CDK-ciclina da fase G1.

Seguidamente, uma fosfatase específica – Cdc14 – que remove o fosfato regulador do factor específico na anáfase. Assim que ele é inibido na fase G1, a concentração de ciclinas mitóticas aumenta, eventualmente atingindo um nível suficientemente elevado para estimular a entrada na mitose subsequente.

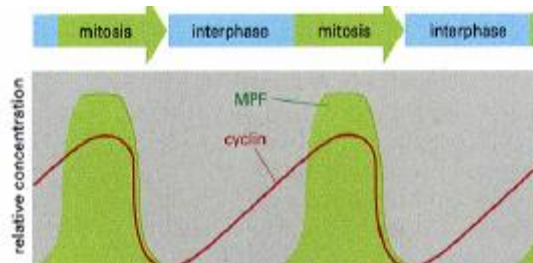


⇒ Actividade do MPF

Em todos os casos, a actividade do MPF e a concentração de ciclinas são determinadas em vários momentos. Observações microscópicas determinam a ocorrência de eventos do início da mitose incluindo a condensação dos cromossomas e a desagregação do envelope nuclear e do fim do mitose como a descondensação cromossómica e a reagregação do envelope nuclear.

O MPF é um complexo proteico com capacidade de induzir a condensação dos cromossomas, a alteração do citosqueleto, e a alteração do invólucro nuclear. As proteínas qe podem sofrer fosforilação são: histonas, lâminas da lâmina nuclear, proteínas associadas aos microtúbulos, filamentos intermédios e proteínas nucleares.

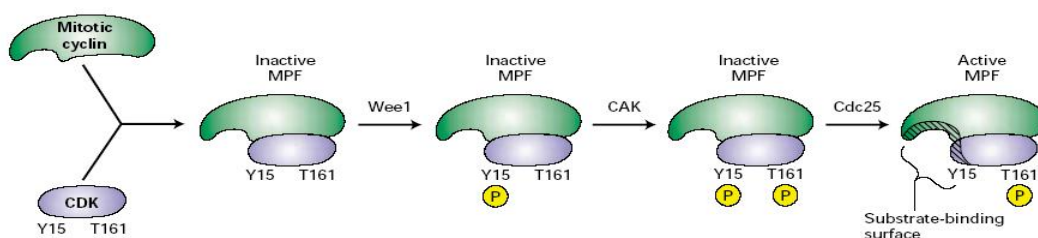
A fosforilação destas proteínas induz a condensação dos cromossomas, porque há proteínas envolvidas na condensação, como a condensina (activada pelo MPF), a desagregação do invólucro nuclear por acção da fosforilação das lâminas, a desagregação do citosqueleto, do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi devido à fosforilação das proteínas microtubulares e dos filamentos intermédios.



3.3. Regulação da actividade do MPF

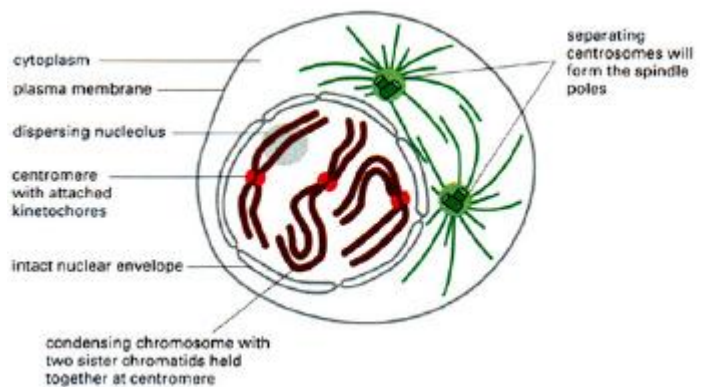
A interacção da ciclina mitótica (Cdc13) com a cinase dependente da ciclina (Cdc2) forma o MPF. A subunidade CDK pode ser fosforilada em dois locais reguladores distintos: através da Wee1 na tirosina-15 (Y15) ou através do CAK na treonina-161 (T161). A remoção do fosfato na Y15 através da fosfatase Cdc25 produz um MPF activo onde a subunidade CDK é monofosforilada na T161.

A subunidade da ciclina mitótica contribui para a especificidade da ligação do substrato pelo MPF, provavelmente através do facto de fazer parte da superfície de ligação do substrato que também inclui o resíduo inibidor da Y15.



3.4. Profase

O início da profase torna-se visível com o aumento de volume nuclear e aparecimento de cromatina organizada sob a forma de longos e finos filamentos – cromossomas – depois de se condensar através das condensinas. Os cromossomas profásicos são dicromatídicos, isto é, cada cromossoma é constituído por duas moléculas de DNA rigorosamente iguais. O nucleólo ou nucleólos iniciam a sua dissipação e, gradualmente, vão desaparecendo no nucleoplasma. Com isto, os microtúbulos citoplasmáticos também se dissociam progressivamente, e o centrossoma separa-se para os pólos do fuso.



3.5. Prometáfase

✚ Início da desorganização e dissipação do invólucro nuclear, dando lugar ao aparecimento de fragmentos desse invólucro, estruturas morfológicamente semelhantes a cisternas do retículo endoplasmático, devido à fosforilação da lâmina nuclear por acção das M-CDKs.

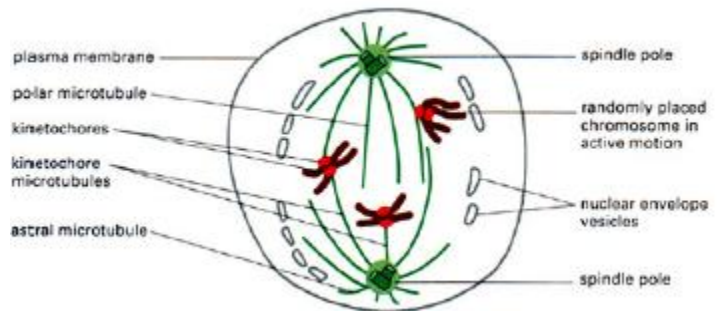
✚ Os cromossomas prometafásicos continuam o seu encurtamento e espessamento, encontrando-se sem posição preferencial no nucleoplasma.

✚ Os cinetocoros dos cromossomas tornam-se visíveis em cada um dos lados do centrómero e, ao mesmo tempo, aparecem os microtúbulos orientados para os pólos do futuro fuso acromático.

✚ Cada cromossoma inicia o processo de orientação e deslocamento para o plano equatorial do fuso, por meio dos diferentes tipos de microtúbulos que, entretanto, se tornaram mais evidentes.

✚ Os centrossomas já se encontram em pólos opostos da célula a partir dos quais crescem microtúbulos que eventualmente estabeleceram uma ligação estável com os cinetocoros.

✚ Os cromossomas continuam a compactar e os braços dos cromátídeos-irmãos separam-se claramente. Quando os cromossomas já estão biorientados, iniciam a migração em direcção à região equatorial da célula.



3.6. Metáfase

✚ Os cromossomas metafásicos (de constituição dicromatídica) localizam-se no plano equatorial do fuso por meio dos seus centrómeros, de forma alinhada.

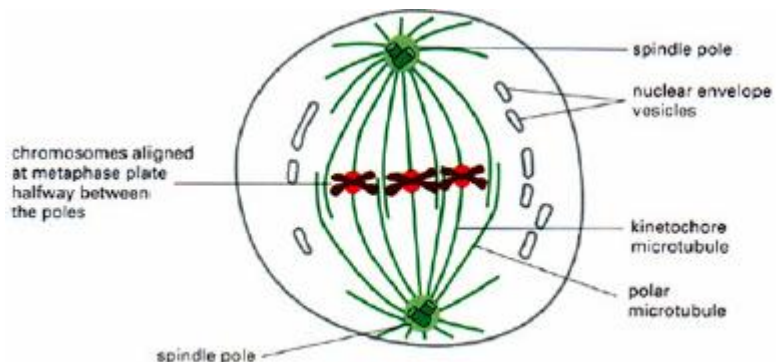
✚ Os cromátídeos tornam-se mais distintos por ligeiro afastamento dos seus braços, ficando apenas aderentes na região do centrómero.

✚ Os cinetocoros e os microtúbulos cinetocorianos tornam-se bem visíveis e orientados longitudinalmente desde cada pólo do fuso acromático até os cinetocoros.

✚ É a fase estática da mitose.

✚ Ocorre a activação do APC ou ciclossoma, e as ciclinas são degradadas.

✚ O MPF é inativado.



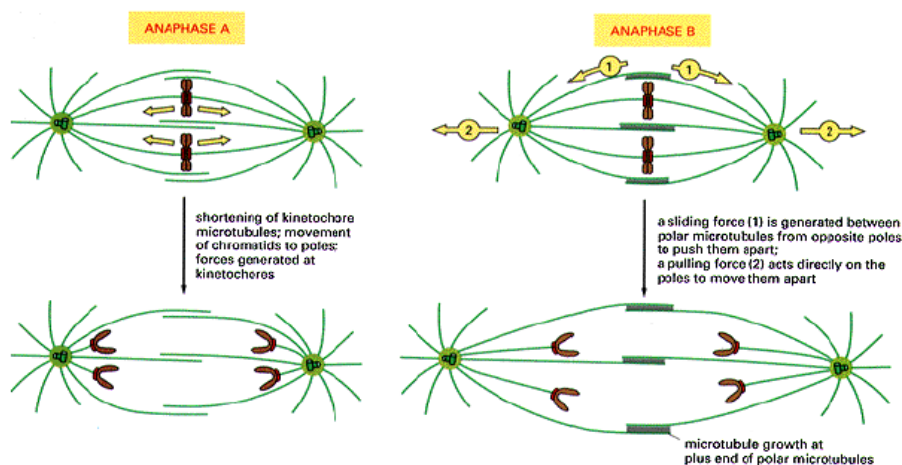
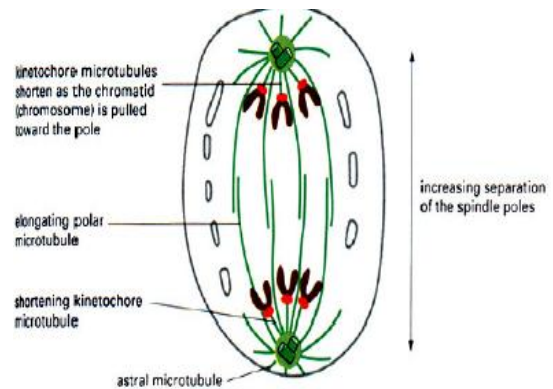
3.7. Anafase

✚ Caracterizada pela ascensão polar de cada um dos cromossomas filhos (cromátídeos-irmãos dos cromossomas metafásicos) resultante da separação dos cromossomas dicromatídicos metafásicos.

✚ **Anafase A** – inicia a anafase, com a dissolução da coesão centromérica, único ponto que unia os cromátídeos de cada um dos cromossomas, sendo repuxado pelos microtúbulos cinetocoríacos, e faz com que os cromátídeos-irmãos (que passam a constituir cromossomas monocromatídicos) se desloquem para os pólos.

✚ **Anafase B** – durante a sua deslocação, os cromossomas continuam com o cinetocoro interligado aos pólos por meio dos microtúbulos cinetocoríacos. Os dois pólos do fuso afastam-se um pouco mais um do outro por alongamento da célula devido à deslocação dos microtúbulos polares e, conseqüentemente, aumentando a distância entre os cromossomas.

✚ Verifica-se um aumento da concentração de cálcio e uma desfosforilação das proteínas.

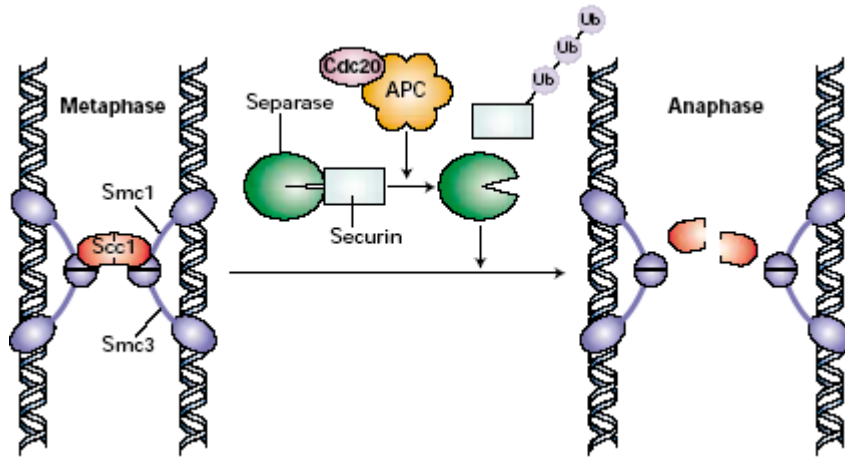


⇒ Separação dos cromátídeos-irmãos

Recentes estudos genéticos indicaram que o APC regula a separação dos cromátídeos-irmãos no início da anafase. As proteínas de coesão SMC ligam-se a cada um dos cromátídeos-irmãos e outras subunidades coesivas como o Scc1 ligam depois as proteínas SMC entre si, com o objectivo de efectuar a associação entre os dois cromátídeos-irmãos. A actividade obtida através desta ligação depende da securina, que está presente em todos os eucariontes.

Assim que os cinetocoros estiverem ligados aos microtúbulos, o APC é dirigido por um factor de especificidade – Cdc20 – que poliubiquitina a securina, conduzindo a célula para o início da anafase. A securina poliubiquitinada é rapidamente degradada por proteossomas, libertando de seguida a separase.

Livre do seu inibidor, a separase cliva o Scc1, partindo a proteína de ligação entre os cromátídeos-irmãos. Assim que esta ligação é quebrada, os cromátídeos-irmãos podem mover-se para os pólos opostos e permitir o desenvolvimento da anafase.



3.8. Telofase

- Reorganização do invólucro nuclear, rodeando os cromossomas que gradualmente se despiralizam e se descondensam tornando-se menos visíveis.

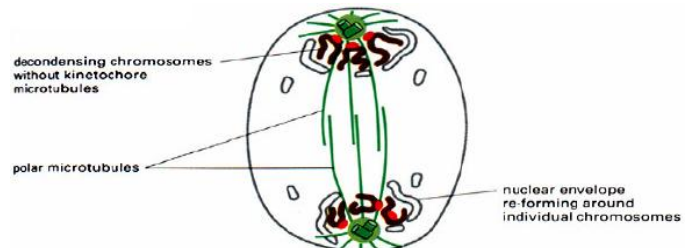
- Ocorre a nucleocinese, isto é, a formação dos núcleos-filhos.

- O centróssoma de cada uma das futuras células-filhas fica localizado na região citoplasmática perinuclear junto ao invólucro nuclear recém-formado.

- A maior parte dos microtúbulos do fuso despolimeriza durante o início da telofase, e só se podem observar numa zona entre os dois núcleos telofásicos.

- Durante o período inicial da telofase, o citosqueleto das células-filhas, baseado nos filamentos intermédios, será alterado, conduzindo uma alteração significativa da morfologia celular. Conjuntamente, começa a haver a redistribuição equitativa dos organelos celulares pelas células-filhas.

- Assim, o nucléolo reaparece e formam-se células diplóides ($\text{DNA} = 2n$).



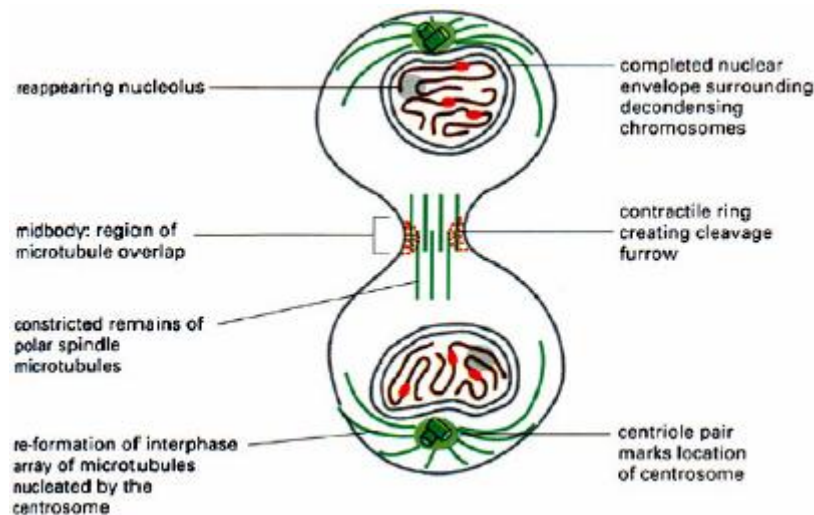
3.9. Citocinese

- O citoplasma é dividido através de um processo denominado de clivagem.

- Na maioria das células, a divisão segue-se rapidamente após a segregação dos cromossomas durante a mitose. A divisão inicia-se durante a anafase B, continua durante a telofase, terminando antes das células entrarem novamente em interfase.

Depende da formação de um anel contráctil, uma estrutura formada por filamentos de actina e miosina II. O anel de contracção, forma-se exactamente a meio da distância existente entre os dois centrossomas do fuso mitótico. É formado por filamentos organizados paralelamente em relação ao plano de divisão e numa associação estreita com a face citoplasmática da membrana celular. Junto aos filamentos de actina, estão os de miosina que, ao longo do processo de divisão, produzem uma força que determina a contracção do anel durante a telofase.

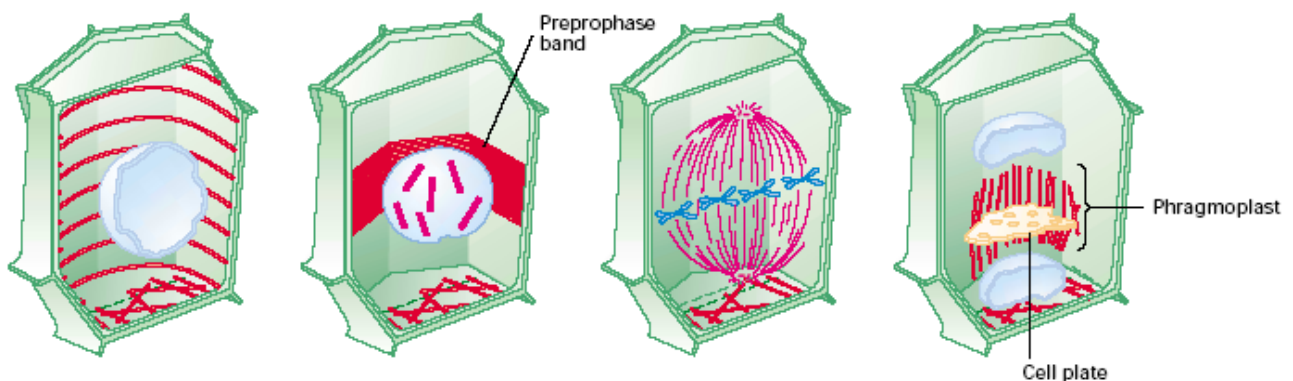
Forma-se o corpo médio que contém a parte central dos microtúbulos polares e um material denso do qual se conhecem alguns componentes, mas pouco se sabe sobre a sua função.



3.10. Mitose nas plantas

Uma grande variedade cortical de microtúbulos rodeiam a célula durante a interfase. Redes de microtúbulos cobrem a parte terminal das células vegetais e permanecem intactos durante a divisão celular. Assim que a célula inicia a profase, os microtúbulos são agrupados junto ao núcleo e reorganizados num rolo semelhante ao que surge na metafase das células animais.

No final da telofase, a membrana nuclear reorganiza-se em torno dos núcleos-filhos e o fragmoplasto derivado do complexo de Golgi é integrado no plano equatorial. Pequenas vesículas adicionais derivadas do complexo de Golgi acumulam-se no plano equatorial e fundem-se com o fragmoplasto formando o plano da nova célula.



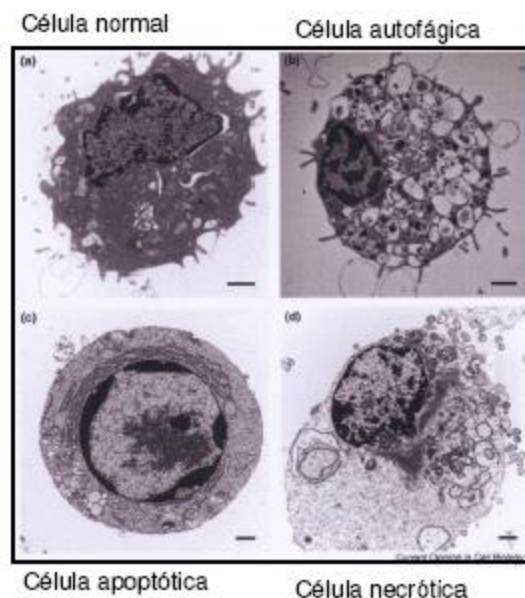
Capítulo 12 – Morte celular

A **morte celular** é um processo comandado por agentes nocivos que podem ser agentes tóxicos ou lesões provocadas mecanicamente. Existem três principais tipos de morte celular:

✚ **Necrose** – é a manifestação final de uma célula que sofreu lesões irreversíveis. O conceito de morte somática envolve a interrupção definitiva das funções orgânicas e dos processos de metabolismo. Assim, a necrose é a morte celular ou tecidual accidental num organismo ainda vivo, ou seja, que ainda conserva as suas funções orgânicas. Nesta morte, a célula sofre alterações membranares, vacuolização generalizada, lise das membranas e inflamação.

✚ **Morte autofágica** – a célula elimina organelos envelhecidos, através da formação de vesículas com o auxílio do retículo endoplasmático liso. De seguida, o autofagossoma, seguindo o mesmo caminho dos fagossomas, funde-se com um endossoma secundário, recebendo enzimas hidrolíticas do complexo de Golgi. É, deste modo, transformado em fagolisossoma. O processo culmina com a degradação do organelo por acção das enzimas. A autofagia pode ser estimulada em determinadas situações, como, por exemplo, durante o jejum prolongado, aparecendo numerosos autofagossomas nos hepatócitos, com o objectivo de converter os componentes da célula em alimento para prolongar a sobrevivência do organismo.

✚ Apoptose



1. Apoptose

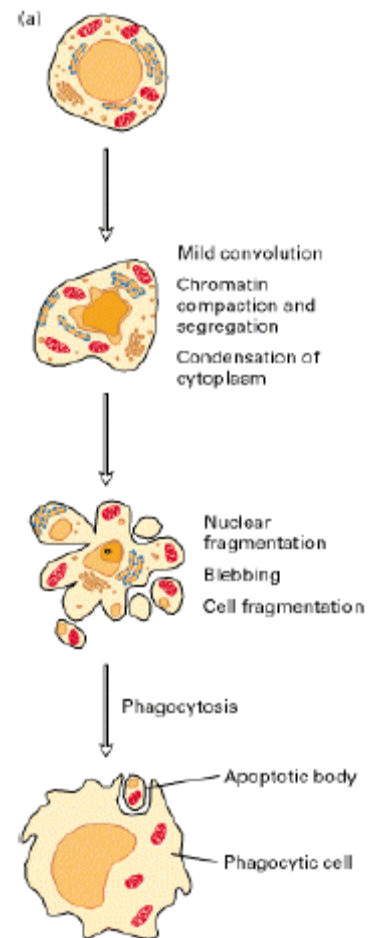
O falecimento das células por morte programada é marcado por uma sequência bem definida de alterações morfológicas, normalmente designado por apoptose.

As células em morte, encolhem e condensam, para depois fragmentar, libertando pequenos corpos apoptóticos, que geralmente são englobados por outras células. O núcleo condensa e o DNA fragmenta-se. De forma importante, os constituintes intracelulares não são libertados para o meio extracelular onde poderiam exercer efeitos de eliminação nas células vizinhas.

Os genes envolvidos na morte celular controlada codificam proteínas com três funções diferentes:

- ✚ “Killer” – importantes para a célula começar o processo apoptótico;
- ✚ “Destruction” – proteínas que digerem o DNA numa célula em apoptose;
- ✚ “Engulfment” – importantes para a fagocitose da célula em apoptose por outra célula.

Na apoptose, ocorre ainda a degradação do citosqueleto, e a exposição da fosfatidilserina para o lado não citosólico da membrana citoplasmática, envolvendo a activação em cascata de enzimas designadas por caspases. Desta forma, as células ficam isoladas, não havendo nem lise das suas membranas nem processo inflamatório associado.



2. Vias Apoptóticas

2.1. Via mitocondrial

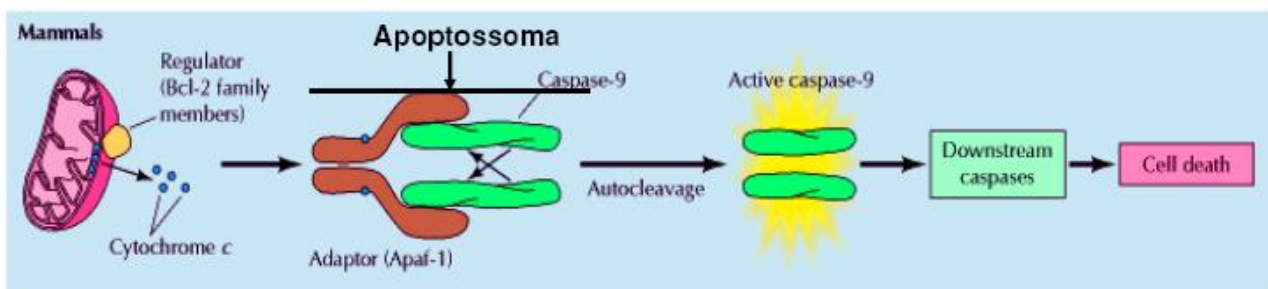
A via mitocondrial envolve membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 que incluem a Bax e a Bid, que normalmente se encontram fracamente associados à membrana externa da mitocôndria, prevalecendo maioritariamente no citosol. A interação entre o Bax e o Bid leva à oligomerização dos elementos, seguida da inserção na membrana externa da mitocôndria. Estas moléculas passam, então, a constituir canais de saída de proteínas intermembranares desde a mitocôndria até ao citoplasma, incluindo o citocromo c e o factor indutor de apoptose.

O citocromo c, uma vez libertado, activa uma proteína citoplasmática (Apaf1), a qual recruta e activa a procaspase-9, constituindo um complexo proteico denominado de apoptossoma. A caspase-9, como “caspase iniciadora” irá requerer e activar a caspase-3 “executora”, a qual degradará proteínas importantes para a variabilidade celular e, também, outras caspases.

As proteínas Bcl-2 e Bcl-xL, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 bloqueiam a morte celular por prevenirem a libertação das proteínas inermembranares da mitocôndria. No entanto, uma vez ultrapassada a fase de morte celular que envolve este organelo, as proteínas anti-apoptóticas deixam de ser qualquer efeito na inibição da apoptose. As proteínas anti-apoptóticas podem interagir entre si, regulando reciprocamente as suas funções.

Por outro lado, a função das “caspases executoras” também pode ser modulada por um outro tipo de proteínas, que se pode ligar à caspase-9 e inibir a sua actividade de protease, bloqueando a este nível o processo apoptótico.

Para todo este processo ocorrer, o Bax e o Bcl-2 têm de estar em equilíbrio para que no final, através de autoclivagem, a caspase-9 se torne activa, induzindo uma cascata de reacções das caspases e a apoptose consequente.



As caspases são sintetizadas sob a forma de precursores inactivos – as procaspases – sendo proteínas altamente conservadas. Existem dois tipos de caspases:

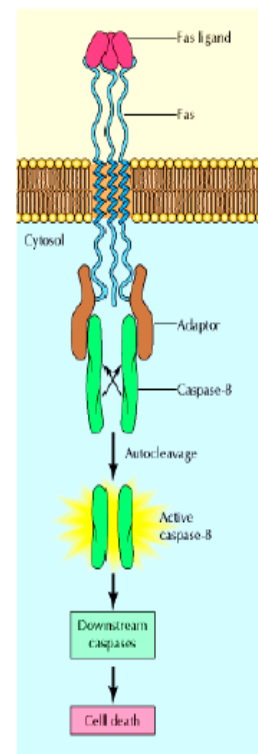
- ✚ Iniciadoras – caspase-8 ou caspase-9
- ✚ Executoras ou Efectoras – caspase-7 ou caspase-3

2.2. Via dos receptores de morte

Paralelamente à via mitocondrial, ocorre também a via dos receptores de morte, que vão desencadear a activação das caspases a partir de diferentes tipos de apoptossomas. Para isso, têm de existir, na membrana, receptores que vão reconhecer proteínas e desencadear a sua ligação e um conjunto de reacções que levam à morte da célula.

Os ligandos podem ser o Fas/Fas-L que é uma proteína, ou o TNF/TNFR que é uma citocina, substância sintetizada por linfócitos e com carácter inflamatório. O Fas-L e o TNF são proteínas do meio extracelular que são receptores nas membranas das células, sendo que o Fas-L reconhece o Fas e o TNF reconhece o TNFR. Quando há ligação do ligando à molécula, o receptor tem de ter domínios intra e extracelulares para desencadear reacções no interior da célula.

O receptor vai reconhecer a procaspase-8 que ao ligar-se ao adaptador, torna-se activa e activa a caspase-3. A caspase-8 por iniciar o processo é uma caspase iniciadora e pode impedir a apoptose quando haja mecanismos celulares que o indiquem, mas a caspase-3, por ser executora, já não pode impedir a apoptose.



Capítulo 13 - Meiose

A **meiose** é um processo de divisão celular através do qual uma célula vê o seu número de cromossomas reduzido a metade. Por este processo são formados gâmetas.

Nos organismos de reprodução sexuada, a formação dos seus gâmetas ocorre por meio desse tipo de divisão celular. Quando ocorre fecundação, pela fusão de dois desses gâmetas, ressurgue uma célula diplóide, que passará por numerosas mitoses comuns até formar um novo indivíduo, cujas células serão, também, diplóides.

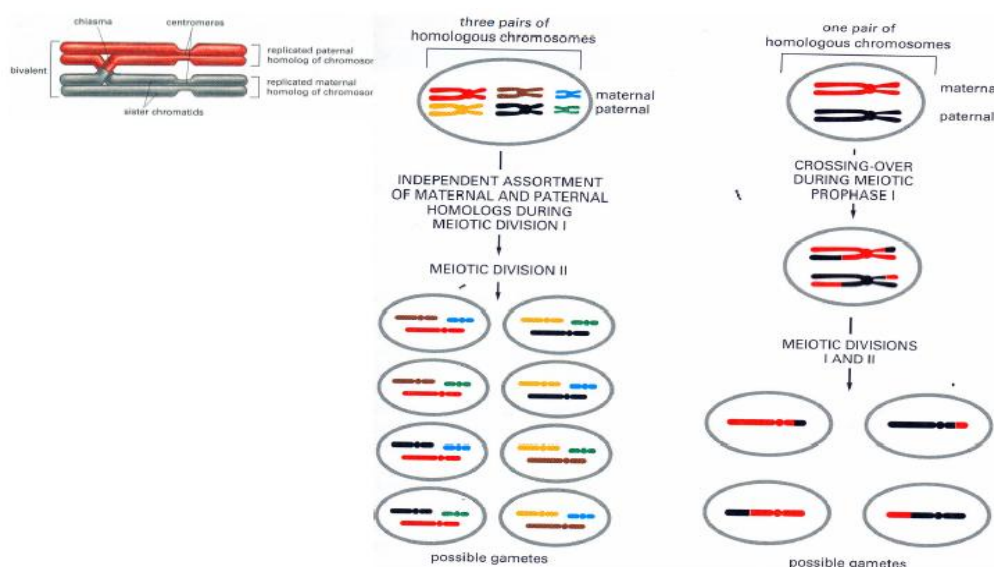
A meiose permite a recombinação génica, de tal forma que cada célula diplóide é capaz de formar quatro células haplóides geneticamente diferentes entre si, explicando a grande variabilidade das espécies com reprodução sexuada.

Os principais acontecimentos meióticos são:

- ✚ Duas divisões de DNA replicado originam quatro células haplóides;
- ✚ Número de cromossomas das células-filhas é metade do número de cromossomas da célula-mãe;
- ✚ Formação do complexo sinaptonémico;
- ✚ Emparelhamento de cromossomas homólogos;
- ✚ Formação de quiasmas.

1. Redistribuição do material genético

Existem cromossomas homólogos, porque são muito semelhantes mas a sequência de DNA não é exactamente a mesma, visto um ser de origem materna e outro ser de origem paterna. Quando há a meiose, ocorre divisão e combinação diferente de todos os cromossomas homólogos, tornando as pessoas geneticamente diferentes.



Para além disto, na meiose também acontece que: dado que os cromossomas homólogos em determinada fase da meiose estão unidos, pode haver o *crossing-over*, fenómeno em que partes de um gene de um cromossoma homólogo podem passar para o outro cromossoma homólogo, aumentando ainda mais a variabilidade genética.

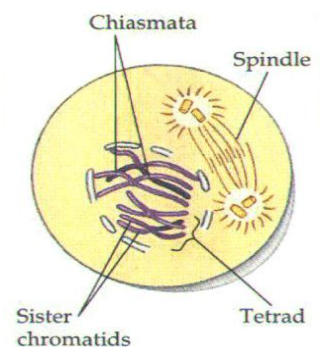
2. Fases da Meiose

A meiose é constituída por duas divisões distintas, sendo que em qualquer uma delas se podem considerar quatro fases: profase, metafase, anafase e telofase.

2.1. Divisão I

Na divisão I da meiose, as células-filhas são haplóides em relação ao número de cromossomas, mas contêm uma quantidade diplóide de DNA. É a divisão mais complexa, sendo designada divisão de redução. Os cromossomas emparelham e trocam material genético (através de *crossing-over*) para, então, darem origem às duas células-filhas.

 **Profase I** – tem um evento único através do emparelhamento dos cromossomas homólogos, através da sinapse. O cromossoma resultante é uma tétrada, sendo composto por dois cromatídeos em cada cromossoma, facilitando a ocorrência do *crossing-over*. Durante este mecanismo, os cromatídeos partem e podem ser re-anexados a um cromossoma homólogo diferente. Consequentemente, em vez de se produzirem dois tipos de cromossomas, são produzidos quatro, duplicando também a variabilidade dos genótipos dos gametas formados. A ocorrência do *crossing-over* é indicada por uma estrutura especial, o quiasma, desde que os alelos recombinantes se alinhem com outros do mesmo tipo. No final da profase I, os cromossomas homólogos separam-se lentamente, devido ao facto de ainda estarem ligados pelo quiasmata. A profase I divide-se em cinco estados:



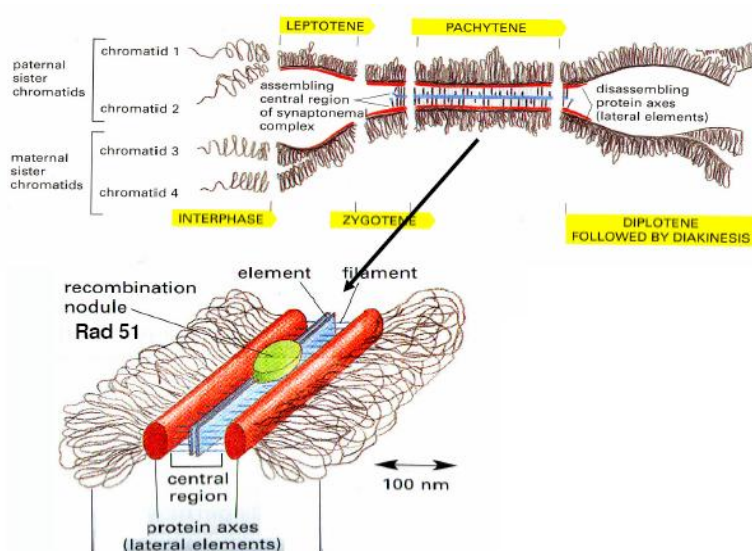
- Leptóteno – condensação dos cromossomas
- Zigóteno – início do desenvolvimento do complexo sinaptonémico
- Paquíteno – surge após a formação do complexo sinaptonémico
- Diplóteno – observação do quiasmata e síntese de moléculas
- Diacinese – dissociação do invólucro nuclear e dos nucléolos e condensação dos cromossomas

⇒ Formação do complexo sinaptonémico

O complexo sinaptonémico é uma estrutura formada entre os cromossomas homólogos, permitindo o emparelhamento de regiões exactamente correspondentes.

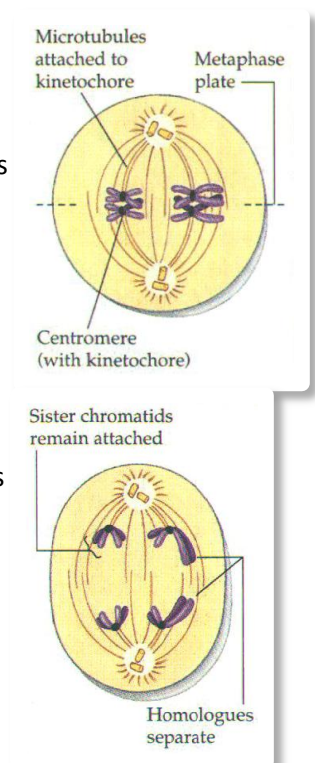
Nos cromossomas homólogos, vai haver estabelecimento de ligações através de um conjunto de proteínas, que vão permitir a ligação entre as moléculas de DNA dos dois cromossomas homólogos. Nesta rede proteica, existem determinadas proteínas em alguns espaços, os nódulos de recombinação, que são os locais onde se dá o crossing-over. Esta troca de genes, não pode ser feita em genes adjacentes, sendo necessário espaçamento. Os nódulos de recombinação também são constituídos por proteínas, muito importantes para a recombinação génica, como a Rad51.

Os nódulos de recombinação aparecem ao longo do complexo, e serão tantos quantos os *crossing-overs* que ocorrerem.



✚ **Metafase I** – as tétradas alinham-se ao longo do plano equatorial. As fibras deste plano ligam-se ao centrómero de cada par de cromossomas homólogos.

✚ **Anafase I** – as tétradas separam-se e deslocam-se para pólos opostos das fibras do plano equatorial. Aqui, os centrómeros permanecem intactos.



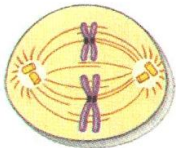
✚ **Telofase I** – muito semelhante à telofase mitótica, excepto no facto de aqui existir apenas um par de cromossomas replicados em cada célula.



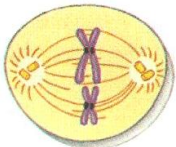
2.2. Divisão II

A segunda divisão meiótica, nas suas linhas gerais, segue os traços de uma divisão mitótica ordinária.

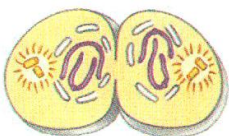
✚ **Profase II** – os envelopes nucleares (caso se tenham formado na telofase I) dissolvem-se e as fibras do plano equatorial reconstituem-se.



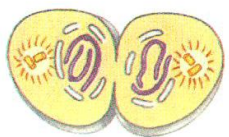
✚ **Metafase II** – os planos movem os cromossomas para a área equatorial e anexam-nos em lados opostos dos centrómeros na região do cinetocoro.



✚ **Anafase II** – os centrómeros rompem e os cromossomas são formados em lados opostos da célula.



Haploid daughter cells



✚ **Telofase II** – idêntica à telofase mitótica, em que as células se dividem.

3. Diferenças entre Meiose e Mitose

Meiose	Mitose
Ocorre em células germinais. Duas divisões	Ocorre em células somáticas. Divisão única.
Um ciclo de replicação do DNA é seguido por duas divisões (meiose I e II) de que resultam quatro células germinais haplóides geneticamente diferentes	Um ciclo de replicação do DNA é seguido por uma divisão de que resultam duas células somáticas diplóides geneticamente idênticas
O número de cromossomas dos produtos meióticos é metade do número cromossómico da célula-mãe	O número de cromossomas das células-filhas é idêntico ao da célula-mãe
A célula que sofre meiose é sempre diplóide. Compreende duas divisões celulares sucessivas	A célula que sofre mitose pode ser diplóide ou haplóide. Compreende apenas uma divisão
Diferencia-se o complexo sinaptonémico	Não ocorre diferenciação do complexo sinaptonémico
Há emparelhamento dos cromossomas homólogos	Não há emparelhamento dos cromossomas homólogos. Cada cromossoma comporta-se independentemente
<i>Crossing-over</i> ou sobre cruzamento entre cromossomas homólogos	Normalmente o <i>crossing-over</i> somático é raríssimo
Formação de quiasmata	Não há formação de quiasmata
Os produtos meióticos não podem empreender outra divisão meiótica, embora possam em alguns organismos empreender divisões meióticas	Produtos mitóticos geralmente são capazes de sofrer outras divisões mitóticas subsequentes
Quatro produtos celulares haplóides (gâmetas ou esporos) produzidos por ciclo diferentes dos progenitores e entre si	Dois produtos diplóides (duas células-filhas) produzidas por ciclo e geneticamente iguais à célula-mãe
Centrómeros dividem-se longitudinalmente apenas na anafase II	Centrómeros dividem-se longitudinalmente na anafase
Formação de tétradas cromossómicas	Não há formação de tétradas cromossómicas
Profase I mais longa	Profase mais curta

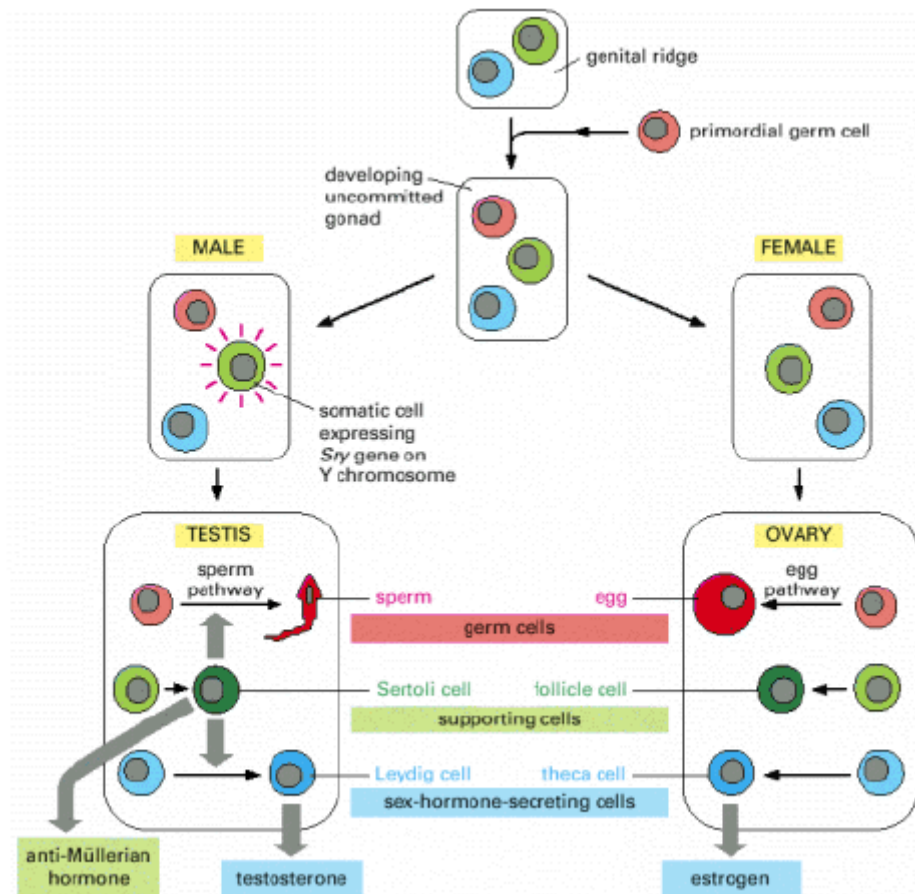
4. Influência do gene Sry

A proteína Sry (*sex determining region of Y*) vai fazer com que as células se transformem nas células originárias das gónadas.

As células precursoras das gónadas, originárias das células germinais, vão para o local onde existem as células a transformar. Se as células precursoras tiverem o cromossoma Y, vai haver expressão da proteína

Sry, que vai fazer com que as células precursoras se transformem e diferenciem em células de Sertoli, que têm a capacidade de sintetizar hormonas que impedem a formação dos órgãos sexuais femininos.

Por outro lado, diferenciam as células precursoras em células de Leydig que vão produzir testosterona, induzindo a formação de células sexuais, os espermatozoides.



5. Oogênese

A oogênese é um processo que ocorre nos ovários que conduz à formação dos gametas femininos. Contrariamente à espermatogénese que se inicia na puberdade, a oogénese inicia-se durante o desenvolvimento embrionário.

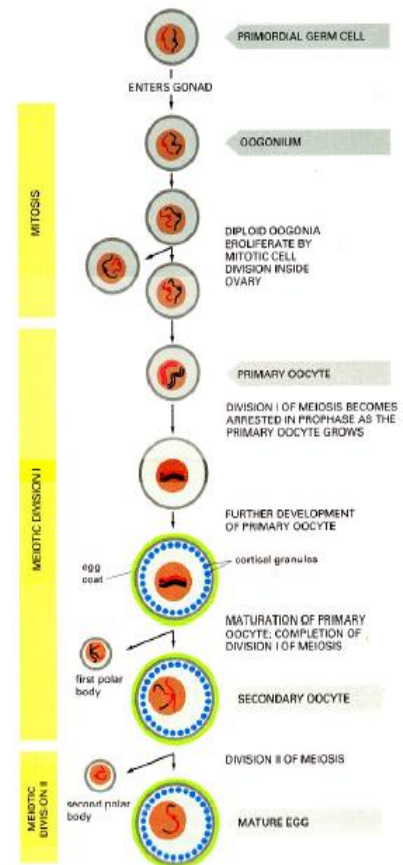
A oogénese é acompanhada da maturação dos folículos ovários; num processo que compreende quatro fases:

✚ **Multiplicação** – durante o desenvolvimento embrionário, as células germinativas – oogónias – multiplicam-se, por mitoses sucessivas.

Crescimento – as oogônias aumentam de volume, devido à síntese e acumulação de substâncias de reserva, originando os oócitos I, que se rodeiam de células foliculares, originando os folículos primordiais. Os oócitos I iniciam a primeira divisão meiótica, que se interrompe em profase I.

Repouso – os folículos primordiais, contendo os oócitos I em profase I, permanecem inativos desde o nascimento até à puberdade. Nesta fase, a maior parte dos folículos primordiais degenera.

Maturação - a maturação do oócito I torna-se evidente quando o folículo atinge a fase de maturação. Quando isto acontece, o oócito I, que se encontrava em profase I, recomeça a divisão da meiose, originando duas células haplóides desiguais: uma maior, o oócito II e uma de menor tamanho, o 1º glóbulo polar. A diferença nos seus tamanhos deve-se a uma citocinese desigual, isto é, o citoplasma divide-se por gemiparidade. Ambas as células se destacam da parede do folículo, para a cavidade folicular. Após a ruptura do folículo de Graaf, com a consequente libertação do seu conteúdo, ocorre a ovulação, isto é, a libertação do oócito II para o pavilhão da trompa.



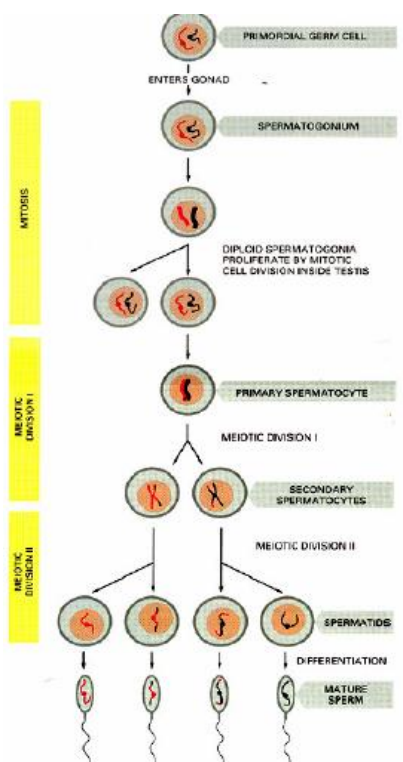
6. Espermatogênese

A espermatogênese é o processo de diferenciação das espermatogônias em espermatozoides que ocorre nos tubos seminíferos dos testículos, de forma centrípeta (da periferia para o lúmen) e compreende quatro fases sucessivas:

Multiplicação – nesta fase, as espermatogônias estão localizadas na periferia dos tubos seminíferos. Desde a puberdade, estas células entram em proliferação constante dividindo-se por mitoses sucessivas.

Crescimento – as espermatogônias aumentam de volume, devido à síntese e acumulação de substâncias de reserva, originando os espermatócitos I.

Maturação – cada espermatócito I (com carga genética $2n$) divide-se por meiose, originando duas células (com carga genética n), mas com cromossomas duplicados, donde vão resultar dois espermatócitos II. Nestes, ocorre a meiose II formando-se 4 espermatídeos, estes já com carga genética n . Nesta divisão meiótica, há a separação de 23

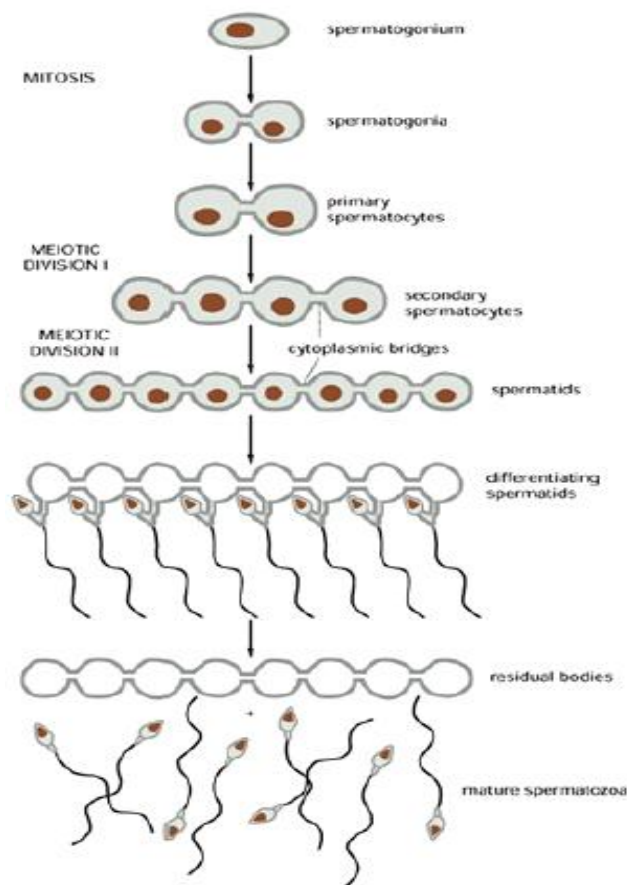


cromátídeos-irmãos.

✚ **Diferenciação** – ocorre uma perda de grande parte do citoplasma, a reorganização dos organelos citoplasmáticos e a diferenciação de um flagelo, a partir dos centríolos. Assim, os espermatídeos sofrem um processo de transformação em espermatozóides.

⇒ Precusores dos espermatozóides

As células precursoras dos espermatozóides não sofrem citocinese durante este processo de divisão. Como não há separação das células, ficam interligadas através de pontes citoplasmáticas. Desta forma, só no final, quando já são espermatozóides, é que estas células se tornam individuais. Esta ligação por pontes citoplasmáticas tem o nome de *sincitium*.



Capítulo 14 – Cancro

O **cancro** compreende genericamente as doenças em que determinado grupo de células do organismo, se divide de forma descontrolada, invadindo os tecidos adjacentes e/ou distantes. É causado por mutações no ADN, que podem ser hereditárias mas, mais frequentemente, são adquiridas ao longo da vida.

Existem vários tipos de cancro:

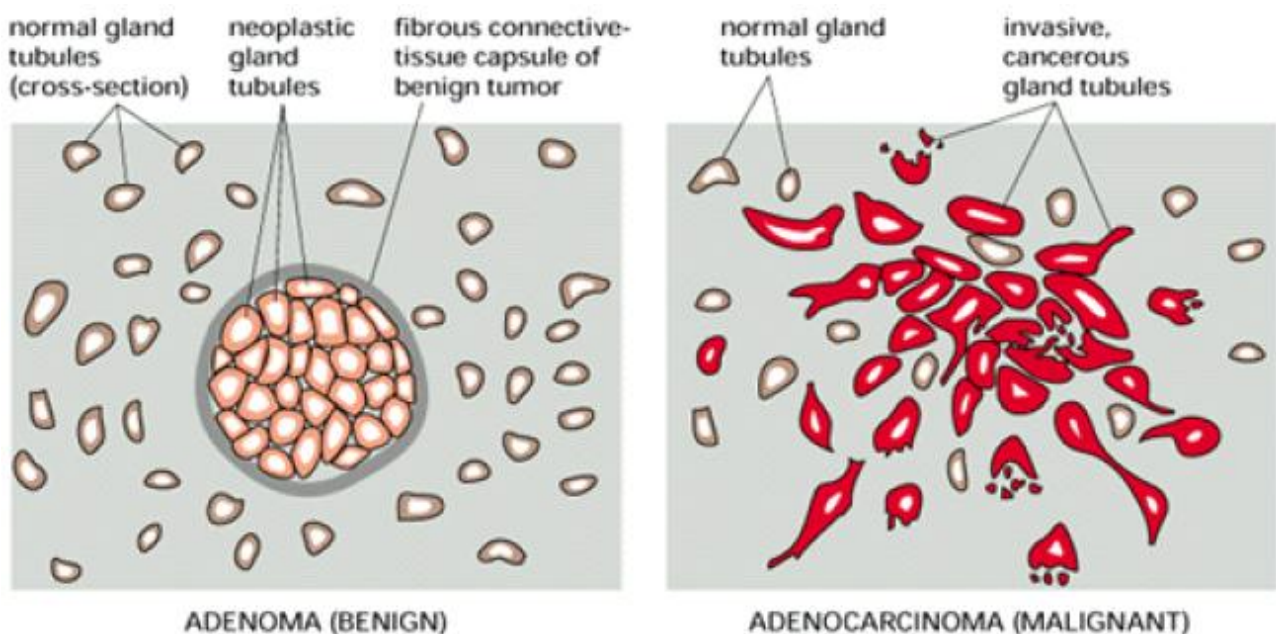
- ✚ Carcinomas – células epiteliais;
- ✚ Sarcomas – tecido conjuntivo ou muscular;
- ✚ Leucemias – células hematopoiéticas.

O cancro adquire geralmente a designação de tumor ou neoplasia quando se forma uma grande massa de células anormais, que pode ser benigna ou maligna.

1. Tumor benigno ou maligno

A principal diferença entre um tumor benigno e um tumor maligno é a sua capacidade de gerar metástases pelo corpo, assim como a velocidade do aumento do tecido afectado, podendo assim medir a agressividade do tumor.

Num **tumor benigno**, a massa de células é não invasiva, sendo que as células ficam como que envolvidas por uma membrana que impede que elas se desenvolvam e se espalhem indefinidamente. Num **tumor maligno**, o descontrolo da divisão pode começar num determinado órgão e espalhar-se por outras áreas do organismo num curto espaço de tempo. Isto acontece porque a massa de células que constitui o tumor é invasiva, passando para os vasos sanguíneos e linfáticos e formando tumores secundários noutras locais.



2. Carcinogénese

O processo de carcinogénese não é mais que o processo de formação de um cancro, sendo que a mutagénese é a produção de uma alteração na sequência de DNA, originando um cancro.

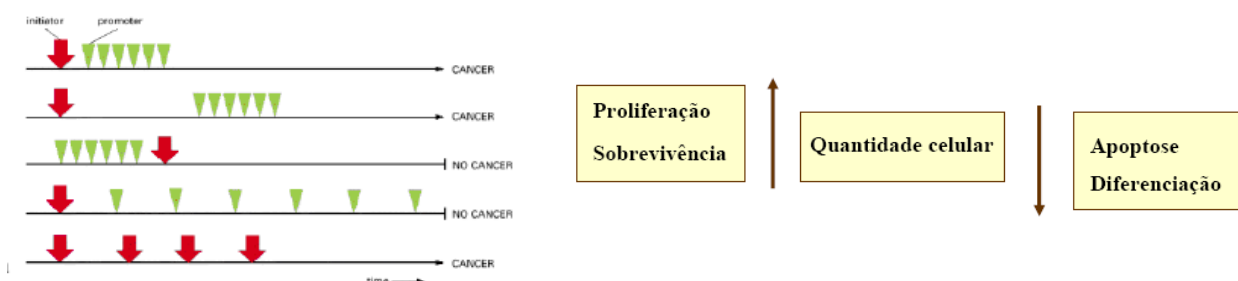
2.1. Agentes carcinogénicos

Os agentes carcinogénicos são agentes mutagénicos, ou seja, substâncias que ao entrarem em contacto com o organismo, induzem a formação de um tumor. Podem ser:

- ✚ **Químicos** – substâncias presentes no ambiente, sejam elas naturais ou sintetizadas pelo Homem, que se ligam ao DNA e causam mutações ou inibem a actividade das enzimas relacionadas com a reparação do DNA. Podem ser directos ou indirectos, consoante a incidência que tiverem no organismo.
- ✚ **Radiações** – as radiações ionizantes e excitantes podem provocar tumores através de mutações génicas, activação de oncogenes e inactivação de anti-oncogenes. Podem provocar vários tipos de mutações cromossómicas, mas o poder mutagénico depende da célula-alvo, da idade do paciente e da resposta imunitária.
- ✚ **Vírus** – substâncias que têm a capacidade de introduzir DNA nas células e induzir mutações.

2.2. Formação de um tumor

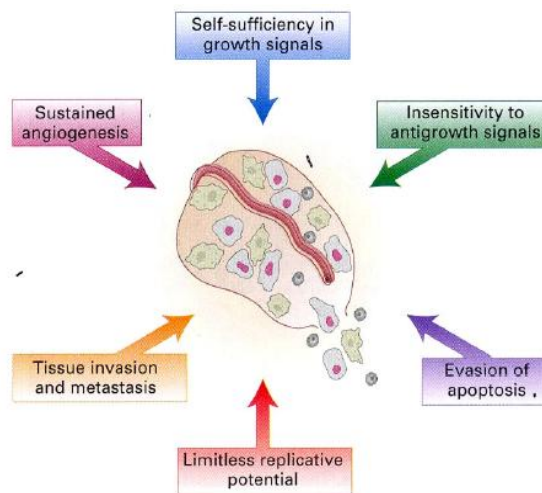
- **Iniciador** – o benzopireno é um mutagénio que por si só não induz a formação de um tumor. Assim, causa lesões genéticas latentes, que quando em contacto prolongado com determinados agentes cancerígenos, pode levar à expressão do cancro em causa.
- **Promotor** – não é propriamente um carcinogénio, mas pode induzir a formação de um tumor quando actua a nível de um tecido previamente exposto a um iniciador.



2.3. Propriedades celulares alteradas durante a carcinogênese

Em primeiro lugar, se existem células que proliferam muito, significa que são células que necessitam de uma grande quantidade de nutrientes.

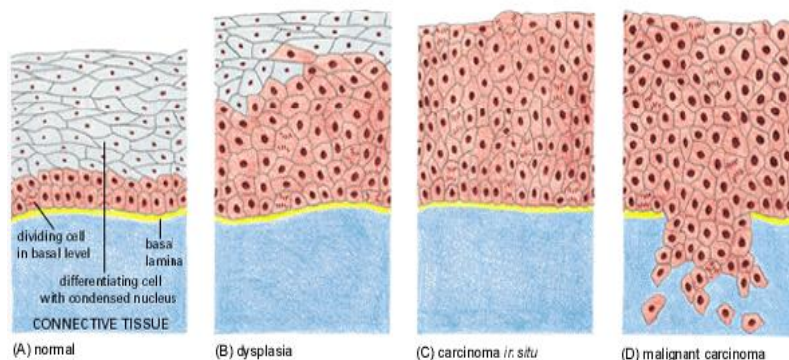
São geneticamente instáveis porque estão continuamente a proliferar, e os mecanismos de reparação de DNA não são eficazes, não conseguindo reparar quaisquer mutações. São evasivas, tendo capacidade de invadir tecidos, a lâmina basal, etc.. Normalmente, metastizam, não morrem por apoptose, não sofrem diferenciação e fogem ao controlo dos sinais internos ou externos de proliferação.



2.4. Crescimento de um tumor

Quando há formação de um tumor, estas células proliferam muito e, como consequência, não têm tempo para se diferenciarem. Por isso, vão invadindo as camadas de células que vão sendo eliminadas, e as células que deviam ser diferenciadas e/ou pouco diferenciadas, passam a ser todas pouco diferenciadas. Como consequência, as células têm estrutura pouco especializada, e forma-se o tumor.

O nucléolo é proeminente porque se as células estão em proliferação, precisam de grande quantidade de nutrientes e há necessidade de síntese de proteínas e de rRNA. Para além disso, a relação entre o núcleo e o citoplasma é bastante elevada e a estrutura celular é pouco especializada.



3. Metástases

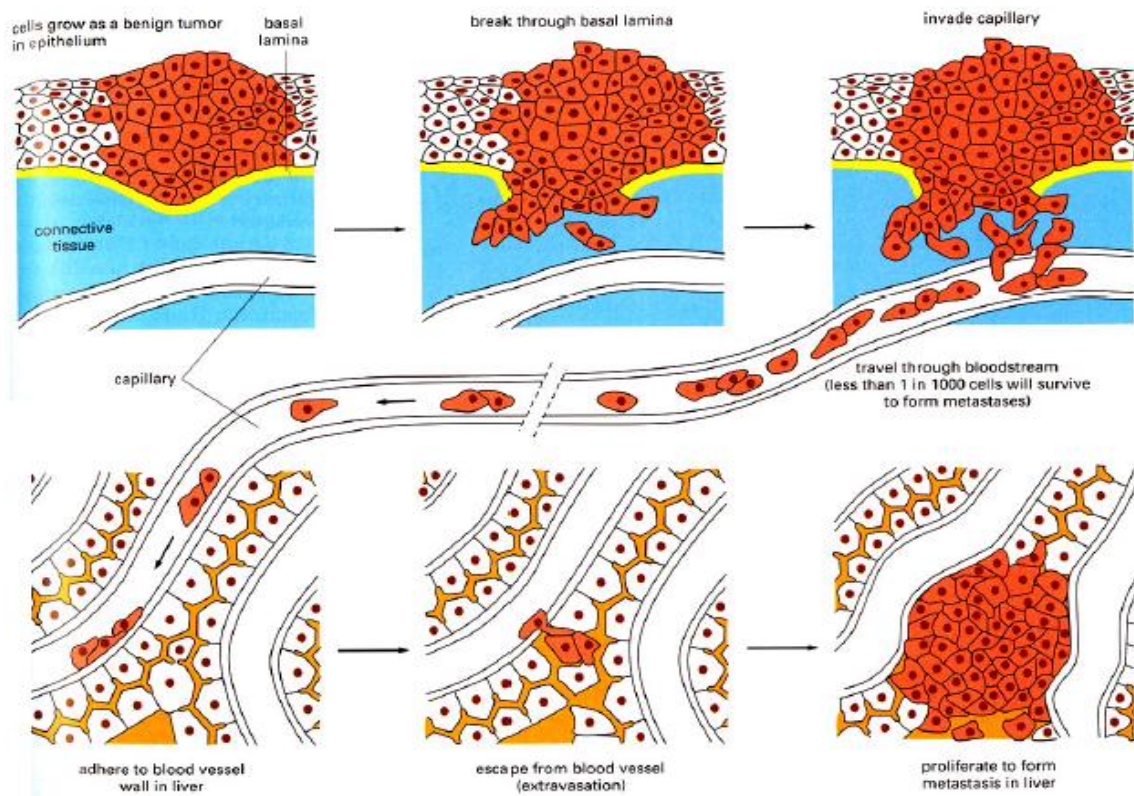
Uma metástase é a formação de uma nova lesão tumoral a partir da primeira mas sem continuidade das duas. Assim sendo, implica que as células neoplásicas se desprendam do tumor primário e caminhem através do interstício, ganhando uma via de disseminação para um local distante onde formam uma nova colónia neoplásica.

Em cada um desses passos, as células malignas têm de superar os sistemas de controlo do organismo que mantêm as células nos seus locais primitivos. Assim, as metástases só ocorrem em tumores malignos e quando surgem, o tumor é quase sempre incurável.

Para metastizar, as células necessitam de:

- ✚ Perder a adesão às células vizinhas – perda da expressão das moléculas de adesão através das E-caderinas;
- ✚ Penetrar em outros tecidos – têm de ter integrinas que funcionam como receptores das lamininas, os quais permitem que a célula adira à lâmina; devem ter à superfície collagenase do tipo IV para degradar a lâmina.

Normalmente, as células cancerígenas morrem mais facilmente que as células normais, devido à irradiação ou exposição a drogas que interferem com o metabolismo do DNA. Para além disso, as alterações na replicação, recombinação e reparação do DNA tornam-nas progressivamente mais vulneráveis.



Capítulo 15 – Parte Laboratorial

1. Microscopia

Os microscópios podem utilizar como fonte luminosa um feixe de fotões ou de electrões sendo designados respectivamente por microscópios fotónicos ou electrónicos. A qualidade de um microscópio é avaliada pelo seu poder de resolução, ou seja pela sua capacidade de formar imagens distintas de dois pontos adjacentes, e não pelo seu poder de ampliação. O poder de resolução do olho humano a uma distância de cerca de 25 cm é de cerca de 0.1 a 0.3 mm, enquanto que o do microscópio óptico é de cerca de 0.2 μm e o do microscópio electrónico é da ordem de 1 Å.

- ✚ **Poder de resolução** – é a função do comprimento de onda da luz utilizada e da abertura numérica. Depende da largura do cone de iluminação, ou seja, depende do condensador e das lentes objectivas.

$$\text{Resolução limite} = \frac{0.61}{n \cdot \sin \theta} \quad \theta - \frac{1}{2} \text{ da largura do ângulo de abertura}$$

n – índice de refacção do meio que separa a amostra da objectiva

- ✚ **Abertura numérica** – é a notação característica da objectiva que relaciona o ângulo de abertura com o índice de refacção do meio situado entre o objecto e a lente frontal da objectiva.

$$\text{Abertura numérica} = n \cdot \sin \mu$$

- ✚ **Ângulo de abertura** – ângulo formado pelos raios luminosos que delimitam o cone de luz que atinge a lente frontal da objectiva. Varia com o índice de refacção do meio existe entre o objecto e a objectiva. Quanto maior a abertura numérica, menor o limite de resolução e, portanto, maior será o poder de resolução.
- ✚ **Visibilidade** - é a capacidade de ver ou detectar um objecto. Os objectos que podem ser observados são: as peças naturalmente corados, as peças coradas artificialmente ou as peças com índices de refacção diferentes dos do meio onde estão inseridos.
- ✚ **Índice de visibilidade** - é a diferença entre os índices de refacção do objecto e do meio.
- ✚ **Poder de ampliação** – é a capacidade de fornecer uma imagem ampliada do objecto.

⇒ **Principais diferenças entre o microscópio óptico e electrónico**

Microscópio óptico	Microscópio electrónico
Lentes de vidro	Lentes electromagnéticas
Feixe de fotões	Feixe de electrões
Poder de resolução cerca de 200 nm	Poder de resolução cerca de 0.1 nm
Amplia cerca de 2.000x	Amplia cerca de 100.000x
Células vivas ou mortas	Células usualmente mortas

1.1. Componentes do microscópio

Sistema mecânico

- Pé
- Braço
- Tubo
- Suporte do condensador
- Suporte do diafragma
- Suporte de porta-filtros
- Parafuso macrométrico
- Parafuso micrométrico
- Botões de controlo da sobreplatina
- Revólver
- Platina
- Pinça de sobreplatina

Sistema óptico

- Fonte luminosa – faz variar a visibilidade e o contraste. O filtro de luz aumenta a visibilidade ou reduz o contraste e vice-versa, conforme a cor do filtro e do objecto. A qualidade da imagem pode ser aperfeiçoada pelo uso de filtros corados que têm influência na composição espectral da luz no tubo do microscópio. Os filtros corados são filtros de absorção de certas radiações, e variam conforme a sua cor e espessura.
- Condensador – fornece à objectiva um cone de luz uniforme, concentra os raios luminosos na preparação e aumenta o poder de resolução
- Diafragma – controla a abertura do cone de luz
- Objectivas – fornecem uma imagem real, ampliada e invertida (imagem intermédia)
- Oculares – fornecem uma imagem virtual, ampliada e direita. O comprimento das oculares varia na razão inversa da ampliação.

1.2. Regras de observação e focagem de um microscópio

✚ **Posição do microscópio** - em frente do observador.

✚ **Posição da preparação microscópica** - apoiada sobre a platina e imobilizada pela pinça da sobreplatina móvel, com a lamela voltada para cima.

✚ **Posição do observador** - sentado de forma a manter uma posição confortável para a observação ao microscópio. Deve observar pelas oculares com os olhos próximos das mesmas. A mão esquerda deve estar, do mesmo lado, sobre o parafuso macrométrico, e tendo a mão direita ocupada com os parafusos da sobreplatina móvel ou com o parafuso micrométrico, ou livre para escrever ou desenhar.

✚ **Focagem do microscópio** - colocar a preparação microscópica na platina e certificar-se de que a mesma está imobilizada pela mola da sobreplatina móvel e voltada para cima. Com a mão direita, mover o parafuso das grandes deslocções, fazendo subir a platina e aproximar, da preparação, uma objectiva de pequena ampliação (4x). Certificar-se de que é esta a objectiva que está no prolongamento do tubo. Em seguida deverá:

- * observar pelas oculares
- * ajustar a posição do condensador
- * abrir o diafragma íris
- * focar, observando pela ocular direita, mantendo o olho esquerdo fechado
- * fechar o olho direito e observar pela ocular esquerda
- * focar com o anel graduado do porta-ocular esquerdo, sem mexer nos botões de comando de focagem
- * regular a distância interpupilar
- * tendo a mão esquerda no botão de comando do parafuso micrométrico que se desloca, continuamente, num e noutro sentido, e tendo a mão direita nos parafusos de deslocação da sobreplatina móvel, pode-se explorar a preparação (fig. 2):
- * uma vez conseguida a focagem, a mão direita fica livre para escrever ou desenhar.

✚ **Mudança de objectiva** - rodar o revólver até colocar a objectiva seguinte em posição de observação, exactamente no prolongamento do tubo:

- * ouvir o estalido (centrar)
- * notar que as objectivas são para-focais : pode-se mudar de uma objectiva para a outra sem necessidade de mover o parafuso macrométrico, bastando, para focar, usar o parafuso micrométrico
- * ajustar a posição do diafragma do condensador, à objectiva (uma objectiva de maior ampliação, necessita de maior abertura do diafragma).

✚ **Utilização da objectiva de imersão** - depois de utilizar a objectiva a seco de maior ampliação, rodar o revólver, deixando-o numa posição que, em relação à posição de observação, seja intermediária entre a objectiva de 40x e a objectiva de imersão:

- * colocar uma gota de óleo de imersão (óleo de cedro) sobre a lâmina
- * rodar o revólver de modo a colocar a objectiva de imersão no prolongamento do tubo
- * observar pelas oculares

* terminada a observação, descer a platina antes de retirar a preparação.

Cuidados a ter

- * Não tocar com os dedos na lente frontal
- * Não tocar com os dedos na lente ocular
- * Não deixar que a lente frontal das objectivas toque na lamela ou lâmina das preparações
- * Não utilizar a objectiva de imersão, sem usar o óleo de cedro
- * Limpar as lentes com um pano macio e um delicado movimento circular
- * Não retirar as objectivas dos seus encaixes no revólver
- * Não desmontar as objectivas nem as oculares
- * Não forçar os parafusos

Recomendações após utilização do microscópio

- * Descer a platina
- * Colocar a objectiva de menor ampliação
- * Limpar a objectiva de imersão, retirando o óleo de cedro (assim como da lente frontal do condensador) com xilol, mas não deixar vestígios deste, porque descola as lentes.

2. Fixadores

Os fixadores são substâncias ou agentes que induzem precipitação ou coagulação das proteínas tornando-as insolúveis. Estes utilizam-se em técnicas citológicas para:

- * inibir a actividade enzimática da célula
- * impedir a actividade e a proliferação de bactérias
- * endurecer as células, para que elas resistam melhor às etapas seguintes das técnicas citológicas
- * aumentar a afinidade das estruturas celulares para os corantes citológicos, tornando-as assim mais facilmente coráveis
- * manter quanto possível a morfologia e estrutura das células

2.1. Tipos de fixadores

Agentes Físicos

 Calor - pode ser seco (chama, ex: bactérias) ou húmido (fervura).

 De um modo geral são métodos grosseiros e violentos que alteram profundamente a estrutura das células.

 Dissecção à temperatura ambiente - em que há evaporação da água das células e dos líquidos intersticiais

 Frio - que por si só não é um agente fixador. O frio actua mais como um agente conservador, pois suspende ou evita temporariamente os processos autolíticos, os quais se restabelecem, logo que a peça deixe de estar submetida ao frio.

Agentes Químicos

✚ Metanol, etanol, ácido clorídrico, ácido picrico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, tetróxido de ósmio, ácido acético, formaldeído etc.

Misturas de fixadores mais usadas em microscopia óptica:

- * Líquido de Bouin (ác. picrico + formol + ác. acético)
- * Líquido de Camoy (etanol + cloroformio + ác. acético)
- * Líquido de Fleming (ác. Acético + trióxido de crómio + tetróxido de ósmio)
- * Líquido de Bouin-Allen (liq. De Bouin + ác croinico + ureia)
- * Líquido de Dubosq-Brazil (sol. alcoólica saturada de ác. picrico + formol + ác. acético)

Quando uma peça é colocada num fixador, a morte das células não ocorre instantaneamente. O fixador penetra na peça por difusão, de tal modo que a maioria das células periféricas fixam-se melhor e mais rapidamente do que as centrais. A rapidez da fixação depende da barreira protéica que se origina na periferia do tecido.

Qualidades de um bom fixador

- * ter um bom poder de penetração
- * ter poder de endurecimento
- * ser rápido para impedir a alteração da estrutura da peça

3. Colorações e corantes

Os corantes podem dividir-se em:

✚ **Corantes naturais:** hematoxilina (extraída de uma leguminosa .pau de campeche), carmin (extraído da cochonilha, não pode ser usado em cortes de parafina), anil (extraído de uma leguminosa . anileiro), orceína (extraída de certos líquenes, corante de fibras elásticas)

✚ **Corantes artificiais:** azul de metileno, azur I, azur II, azul de toluidina, vermelho neutro, etc.

Os corantes artificiais são compostos orgânicos da série aromática. Nem todas as substâncias coradas, orgânicas ou não, podem ser considerados corantes. Se existirem determinados grupos atômicos, chamados cromóforos, como o grupo nítrico (NO₂), nitroso (NO), azo (NN), que se combinem com moléculas de hidrocarbonetos aromáticos transformam-nas em cromogéneos, ou seja, em compostos capazes de gerar corantes.. Para que um cromogéneo se transforme em corante necessita, por sua vez, de

se ligar a auxocrómios, agrupamentos com funções ácidas ou básicas, que permitem a formação de sais.

Tipos de corantes artificiais:

- * ácidos - eosina, fucsina ácida, vermelho congo
- * básicos - vermelho neutro, verde de metilo, azul de metileno
- * neutros - eosinato de azur de metileno.

➔ Consoante a afinidade de determinadas estruturas das células ou tecidos para com um dado tipo de corantes as estruturas podem ser designadas por:

- * acidófilas - se coram com um corante ácido (citoplasma)
- * basófilas - se coram com um corante básico (cromatina)

Para as preparações fixadas por processos químicos, um constituinte celular basófilo pode passar a acidófilo, uma vez que a constituição físico-química dos tecidos poderá ser alterada.

Tipos de coloração quanto ao método de actuação do corante

- * Coloração simples ou progressiva - o corante deve deixar de actuar no momento em que a estrutura celular, que se pretende evidenciar, atinja a coloração desejada.
- * Coloração regressiva - há uma sobrecoloração recorrendo-se a um diferenciador (álcool a 90°, álcool clorídrico) que progressivamente vai descorando até se atingir a coloração desejada. Para este tipo de coloração os cortes têm de ser muito finos e de igual espessura, o soluto corante e o diferenciador devem ser diluídos
- * Coloração com mordentes - a actuação do corante é precedida de um banho com mordentes, substâncias que actuam sobre as estruturas aumentando a sua afinidade para os corantes ou o mordente está contido na solução de coloração. Um dos mordentes mais usados é o sulfato de alumínio. A hematoxilina é um exemplo de um corante que necessita de mordentes.

4. Técnicas citológicas

Podemos considerar três tipos de preparações para os microscópios ópticos:

4.1. Preparações a fresco ou extemporâneas

É um tipo de preparação utilizada a todo o momento, porque permite uma observação rápida e imediata. As células são colocadas entre lâmina e lamela. Por vezes utilizam-se lâminas escavadas que impedem a compressão dos microorganismos a observar.

Os meios usados devem ter características (ex: pH e isotonicidade), tanto quanto possível, idênticas ao meio onde vivem normalmente as células a observar.

As preparações a fresco permitem observar: (não permitem distinguir estruturas que apresentem o mesmo índice de refração do citoplasma)

- + Movimentos de ciclose
- + Cristais e cristalóides
- + Núcleo e nucléolo
- + Vacúolos
- + Grãos e secreção e gotículas lipídicas

Nestas preparações podem-se utilizar os chamados corantes vitais (corantes que se utilizam em concentrações muito diluídas). Exemplos de corantes vitais - vermelho neutro, vermelho congo, azul de metileno, verde Janus (cora as mitocôndrias). azul brilhante de cresilo, azur I, azur II.

Muitos corantes coram certas estruturas com uma cor diferente da sua ou seja, são corantes reveladores de reacções químicas e são designados por corantes metacromáticos (ex: Vermelho neutro - cor vermelho violácea - a pH ácido fica vermelho cereja e a pH alcalino muda para amarelo/acastanhado ou alaranjado; o vermelho congo fica azul a pH ácido).

Limitações do exame a fresco

- + Só se aplica a materiais suficientemente transparentes.
- + A nutrição das células não é suficiente e dentro de horas, as células começam a mostrar sinais de degenerescência e posteriormente morrem.
- + As observações têm assim uma duração muito limitada, sendo portanto preparações efêmeras que não se podem conservar.

Observações *in vivo* e *in vitro*

- + A observação *in vivo* corresponde ao estudo das células no seu próprio meio. É um método muito utilizado para o estudo dos seres vivos de pequenas dimensões (protozoários e bactérias).
- + A observação *in vitro* permite o estudo das células vivas. Estas são previamente retiradas do meio natural em que vivem e são colocadas em soluções com composição química bem definida, de forma a que se processe sem qualquer alteração o metabolismo celular.

4.2. Preparações definitivas sem inclusões

Este tipo de preparação é constituída por diversas etapas:

- + Colheita da peça
- + Lavagem - depende da natureza da peça
- + Fixação - o tempo de fixação é muito variável
- + Dissociação – consiste em subdividir a peça em pequenos fragmentos que posteriormente possam ser facilmente manuseados e observados. Nesta fase podem-se empregar métodos físicos ou métodos químicos.

Métodos Físicos

- Distensão - estender a peça ao longo de uma lâmina sob a forma de uma fina camada (ex. esfregaço sanguíneo)
- Dilaceração - separação das várias partes da peça separando-as com o auxílio de agulhas de dissecação (ex. preparações de fibras musculares)
- Agitação - coloca-se a peça num tubo de ensaio e agita-se, separando as várias partes da peça (ex. preparações de fibras nervosas)
- Raspagem - consiste em recolher com o bisturi o produto a observar (ex. preparações das células da mucosa lingual ou bucal)
- Compressão - pressão da lamela sobre a lâmina de modo a que a peça sofra distensão (ex. observação de parasitas)
- Centrifugação ou ultracentrifugação - dissociação mecânica dos vários componentes celulares (ex. preparações de mitocôndrias)

Métodos Químicos – enzimas, álcool a 30º-40º, hidróxido de sódio ou potássio, ácido azótico ou sulfúrico diluídos, água fervente, etc. A dissociação química pode ter diferentes designações consoante os dissociadores usados:

- Digestão – utilização de enzimas
- Descalcificação – utilização de ácidos azótico, fórmico, tricloroacético etc., em soluções aquosas de 1% a 5% durante 10 a 20h.

- ✚ Lavagem - esta fase depende do dissociador usado
- ✚ Coloração
- ✚ Desidratação - esta desidratação é feita com uma série ascendente de álcoois ou acetona. (Ex. álcool a 50º, 75º, 90º, 100º e benzol ou xilol)
- ✚ Montagem - cobre-se a preparação com um meio de montagem (bálsamo do Canadá, glicerina, gelatina), que geralmente é viscoso e endurece com o tempo, por fim coloca-se uma lamela de protecção
- ✚ Secagem - estufa a 50-60°C
- ✚ Lutagem - proteger os bordos da lamela com betume da Coreia, verniz ou parafina derretida, impedindo assim a entrada de impurezas
- ✚ Etiquetagem - a etiqueta deve conter o nome da peça, fixador, corantes, data e nº da preparação

4.3. Preparações definitivas com inclusão

Microscopia Óptica

- ✚ Colheita - a peça depois de colhida, deve ser rapidamente colocada num fixador.
- ✚ Fixação - pode variar de algumas horas a dias ou semanas.
- ✚ Desidratação - compreende a passagem por uma série ascendente de álcoois (por exemplo 70º, 80º, 90º, 100º e benzol) cujo tempo de passagem varia com vários factores. Geralmente usa-se 60 a 120

minutos em cada passo. Esta etapa é necessária, dado que nos passos seguintes se utiliza a parafina, que é formada por uma mistura de hidrocarbonetos e é insolúvel em água.

✚ Impregnação - é feita com uma mistura de benzol/parafina (1:1), a 56°C, durante 1 hora, seguido de um banho de parafina, à temperatura de 56° C, durante 1 hora.

✚ Inclusão - a peça juntamente com a parafina são colocadas em moldes especiais, ficando a peça incluída em parafina, após a solidificação da mesma. Separa-se o bloco dos moldes e este pode permanecer assim até ser cortado.

✚ Corte - é efectuado por meio de uma faca colocada num aparelho especial chamado micrótomo, no qual se regula a espessura do corte. Normalmente faz-se um corte de 4-8 μ m de espessura, mas tudo depende da natureza do tecido e do estudo que se pretende realizar.

✚ Colagem e Secagem - o corte obtido é colocado com água albuminosa, a 37°C, sobre uma lâmina de vidro, indo depois para a estufa a 40° onde permanece 1 a 2 dias.

✚ Desparafinação - é feita em xilol.

✚ Rehidratação - é realizada na série descendente de álcoois (de álcool absoluto até álcool a 50° e depois em água).

✚ Coloração - geralmente efectuada por corantes aquosos. Se o corante é alcoólico, deve-se proceder à rehidratação até ao grau alcoólico correspondente à solução alcoólica do corante. Geralmente utiliza-se uma associação de dois corantes aquosos. Primeiro colocam-se as lâminas contendo os cortes (em tinas com ranhuras) em hematoxilina (de cor arroxeadas) durante 10 a 15 minutos. Depois, lavam-se em água corrente e coram-se nas mesmas condições com a eosina (de cor avermelhada) durante 2 a 5 minutos.

✚ Lavagem - em água durante 30 minutos.

✚ Desidratação - é feita numa série ascendente de álcoois demorando cerca de 1 minuto em cada passagem.

✚ Montagem, Secagem, Lutagem e Etiquetagem

Microscopia Electrónica

✚ Colheita - consiste em retirar a peça histológica, lavá-la se necessário e cortá-la em pequenas porções (volume não deve ser maior que o tamanho da cabeça de um alfinete, 0,5 a 1 mm³). Deve ser colocada rapidamente no fixador.

✚ Fixação - esta operação consiste, em geral, em dois tipos de fixação, que podem ser seguidos ou intercalados por uma lavagem em tampão durante 1 ou 2 horas.

- Gluteraldeído de 1 a 4% (1º fixador), durante 2 horas a 4°C.

- Lavagem com solução tampão durante 1 a 12 horas a 4°C, se for caso disso.

- Tetróxido de ósmio de 1 a 2% (2º fixador ou pos-fixador), durante 2 horas.

✚ Desidratação - consiste em retirar a água da peça citológica numa série ascendente de álcoois, com tempos variáveis.

✚ Impregnação - consiste em introduzir as peças citológicas numa mistura de &ido de propileno com epon ou araldite, cuja concentração deve aumentar do seguinte modo:

- | | |
|---|------------------|
| - 1º mistura de ox. prop. + epon (3:1) | 1 hora |
| - 2º mistura de ox. prop. + epon (1 :1) | 1 hora |
| - 3º mistura de ox. prop. + epon (1 :3) | 1 hora |
| - 4º epon | 1 hora |
| - 5º epon | 30 minutos a 60º |

✚ **Inclusão** - as peças histológicas são retiradas do epon e colocadas em cápsulas de gelatina, devidamente numeradas, e nelas é introduzido novo epon. O epon é uma substância viscosa que polimeriza a uma temperatura de 50-55°C, pelo que endurece, decorridos 2-3 dias a 60°C. Os blocos assim formados, ficam a constituir peças que podem ser utilizadas muito mais tarde.

✚ **Corte** - os cortes são feitos por meio de facas de vidro ou de diamante em aparelhos designados por ultramicrotomos. Inicialmente fazem-se cortes semi- finos de 1 µm que permite um estudo preliminar da peça ao ME. Em seguida, fazem-se cortes ultra-finos de 600-700 Å de espessura. Os cortes assim obtidos são recolhidos em pequenas grelhas de cobre.

✚ **Coloração** - não é uma designação correcta dado que os produtos usados como “corantes” não coram as organelas, mas imprimem-lhe um determinado contraste e têm a designação de contrastantes. coloração é dupla: acetato de uranilo (20 a 30 minutos) e o hidróxido de chumbo (10 a 15 minutos).

✚ **Observação** - depois de contrastados os cortes já podem ser observados ao microscópio electrónico e se necessário fotografados.

5. Micrometria

A micrometria é o capítulo da microscopia que determina as dimensões de microorganismos ou peças de tamanho mínimo, fazendo a medição em micrómetros cuja unidade métrica é a micra (µm ou µ). Utilizam-se dois micrómetros (régua graduada): ocular e objectivo.

Micrómetro objectivo – é uma régua graduada, de 1 mm, dividida em cem partes iguais que se coloca na platina. Cada divisão do micrómetro é igual a 10^{-2} mm = 10 µm.

Ocular micrométrica - é um disco de vidro, que se coloca na ocular, tendo gravada uma escala dividida em cem partes iguais.

Coeficiente micrométrico – é o valor, em micras, de cada divisão do micrómetro ocular para um determinado sistema ocular-objectivo.

⇒ **Determinação do coeficiente micrométrico para um determinado sistema ocular-objectivo**

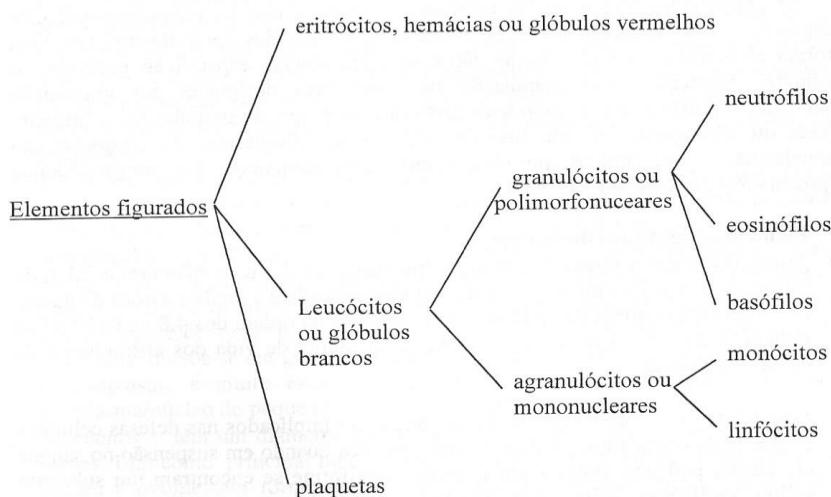
- ✚ Depois de iluminar o microscópio, coloca-se o micrómetro objectivo na platina e coloca-se o micrómetro ocular numa das oculares.
- ✚ A escala do micrómetro objectivo constitui o objecto a observar. A escala do micrómetro ocular e a imagem do micrómetro objectivo encontram-se no mesmo plano de focagem.
- ✚ Rodando a ocular micrométrica, sobrepõe-se, em posição paralela, as duas escalas, e faz-se coincidir, exactamente, o zero.
- ✚ Regista-se o número exacto de intervalos do micrómetro objectivo que correspondem a um número exacto de intervalos do micrómetro ocular.

Medição de um objecto - conhecido este valor, quando se pretende medir qualquer objecto usando aquele sistema ocular-objectivo, bastará substituir o micrómetro objectivo pela preparação que contém o objecto em causa. Contam-se as divisões da ocular micrométrica, nas quais está compreendido o objecto, e multiplica-se o número de divisões pelo valor do coeficiente micrométrico. Se o objecto ocupar 20 divisões, multiplica-se este valor por 4 μm e a medição real do objecto será de 80 μm .

Câmara clara - é um dispositivo que se adapta ao microscópio para desenhar. Sendo constituída por um sistema de dois espelhos planos ou dois prismas de reflexão total. Este dispositivo projecta no plano da imagem intermediária, uma imagem real e direita da folha de papel de desenho e da ponta do lápis. Um observador olhando através da ocular do microscópio vê simultaneamente a preparação microscópica e as imagens dos pontos de um plano exterior ao microscópio. Através da câmara clara pode-se determinar o valor real de um objecto desenhado com ampliação conhecida.

6. Sangue

O sangue é uma massa líquida formada por duas fases: elementos figurados e plasma.



Plasma – fase líquida que contém em suspensão os elementos figurados e também proteínas, sais inorgânicos, compostos orgânicos, tais como aminoácidos, vitaminas, hormonas, hidratos de carbono e lípidos.

6.1. Funções do sangue

- ✚ O sangue actua essencialmente como meio de transporte;
- ✚ Por seu intermédio, os leucócitos fagocitários (neutrófilos) actuam como uma das primeiras barreiras contra a infecção. Estas células ao percorrerem todo o organismo atingem o local da infecção e atravessam a parede dos capilares (diapedese);
- ✚ O sangue transporta o oxigénio ligado à hemoglobina dos eritrócitos, e o gás carbónico (CO₂), ligado à hemoglobina ou dissolvido no plasma sob a forma de bicarbonato;
- ✚ Actua na distribuição de hormonas;
- ✚ Tem um papel regulador na distribuição do calor, do equilíbrio ácido-básico e do equilíbrio osmótico;
- ✚ Permite a troca de mensagens químicas entre órgãos distintos.

As células do sangue geralmente não se multiplicam na corrente sanguínea, têm uma duração relativamente curta e são continuamente substituídas por células novas produzidas em órgãos especializados. Antes de atingirem o estado de maturação, os elementos figurados do sangue passam por diferentes etapas de diferenciação.

Os eritrócitos, os granulócitos e as plaquetas têm origem na medula óssea (tecido mieloide). Pode, todavia observar-se eritropoiese extra-medular em casos de carência.

Os linfócitos e monócitos têm também origem na medula óssea e diferenciam-se nos órgãos linfóides: medula óssea, baço, timo e nódulos linfáticos das mucosas.

Os granulócitos têm o núcleo de forma irregular e têm no citoplasma grânulos específicos com diferente afinidade tintorial. O núcleo dos agranulócitos tem uma forma mais regular e o citoplasma não possui granulações específicas, podendo, no entanto, apresentar uma granulação não específica designada por granulação azurófila. Enquanto que o monócito apresenta este tipo de granulação, o linfócito pode ou não apresentar este tipo de grânulos no citoplasma. As plaquetas são anucleadas e constituídas por fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos (precursores das células).

6.2. Elementos figurados do sangue

✚ **Eritrócitos** - têm a forma de um disco bicôncavo de 7,2 µm de diâmetro e 2,1 µm de espessura, o que lhes proporciona uma grande superfície e facilita a troca de gases. A concentração normal dos eritrócitos no sangue é da ordem dos 4,8 1,0x10¹²/l na mulher, e de 5,5 1,0x10¹²/l no homem. O tempo de vida dos eritrócitos é de cerca de 120 dias.

 **Leucócitos** - são corpúsculos incolores que estão implicados nas defesas celulares e imunes do organismo. Têm uma forma esférica quando em suspensão no sangue circulante, podendo assumir um aspecto amebiforme se encontram um substrato sólido. Verifica-se muitas vezes que os leucócitos deixam os capilares e penetram no tecido conjuntivo. O número total de leucócitos no adulto é de $7,5 \times 10^9/l$, sendo estes valores inferiores à nascença. O aumento e a diminuição do número de leucócitos no sangue designa-se, respectivamente, por leucocitose e leucopenia.

 **Neutrófilos** - têm cerca de 12μ de diâmetro, são esféricos enquanto circulantes, condição em que parecem inactivos, deformando-se logo que encontram um substrato sólido sobre o qual emitem pseudópodes, movimentando-se a uma velocidade de 19 a $36 \mu m$ por minuto. Constituem a primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos e são fagócitos activos de partículas de pequenas dimensões.

O núcleo pouco volumoso é formado por 2 a 5 lóbulos (geralmente 3), ligados entre si por finas pontes de cromatina. As formas com mais de 5 lóbulos são designadas hipersegmentadas e representam células envelhecidas. Nos indivíduos do sexo feminino aparece frequentemente um apêndice, muito menor que o lóbulo nuclear, com a forma de uma raquete, que é designado por “baqueta” e que contém a cromatina sexual, constituída normalmente por um cromossoma X heterocromático.

O citoplasma do neutrófilo é abundante e carregado de pequenas granações neutrófilas (dado que apresentam o mesmo tipo de afinidade para todos os componentes do corante Romanovsky), cujas dimensões ($0,3$ a $0,8 \mu$) se situam próximo do limite de resolução do microscópio

 **Basófilos** - medem cerca de 12μ de diâmetro. Embora não sejam muito activos, são capazes de movimentação amibóide e de fagocitose. O núcleo é volumoso e de forma irregular tomando geralmente a forma de um S. O citoplasma é carregado de grânulos basófilos, de cor roxa (esta cor deve-se às propriedades metacromáticas da histamina, que é um dos constituintes desta granulação) e de maiores dimensões que as dos outros granulócitos, as quais sobrepõem o núcleo obscurecendo-o.

 **Eosinófilos** - têm um diâmetro de cerca de 9μ e são células dotadas de movimento amibóide e capacidade de fagocitar. Esta fagocitose processa-se de um modo mais lento, mas é mais selectiva. O núcleo é geralmente bilobulado, podendo apresentar 3 lóbulos. A principal característica dos eosinófilos é a presença de granações ovóides que coram pela eosina (granulações acidófilas, cor alaranjada) e que são maiores que as dos neutrófilos. A membrana do citoplasma é recortada devido às granações.

 **Linfócitos** - são células esféricas, com diâmetro variável entre 6 a 8μ , que têm a designação de pequenos linfócitos. Juntamente com estes, ocorre uma pequena percentagem de linfócitos médios e grandes linfócitos. Embora morfologicamente semelhantes, os linfócitos constituem uma população celular heterogénea. Variam em tamanho, em densidade e em longevidade (alguns vivem poucos dias e outros podem viver até 10 anos). O linfócito pequeno, que predomina no sangue, tem o núcleo esférico, oval ou reniforme, geralmente em posição excêntrica. A cromatina dispõe-se em grumos grosseiros (é mais compacta que a do monócito). O citoplasma é muito escasso no pequeno linfócito, aumentando a relação citoplasma/núcleo do pequeno para o grande linfócito.

 **Monócitos** - têm um diâmetro variável entre 9 e 12μ . Podem viver semanas ou meses. Têm como principal função a fagocitose de vírus, fungos e protozoários. O núcleo é ovóide, em forma de

rim, ferradura ou enovelado, sendo geralmente excêntrico. A cromatina é pouco densa, o núcleo dos monócitos é mais claro do que o dos linfócitos. Tem o citoplasma bem definido e com granulação azurófila de dimensões inferiores ao poder de resolução do microscópio, que lhe confere um tom purpura.

 **Plaquetas** - são corpúsculos anucleados com a forma de disco, que medem cerca de 3 μ de diâmetro e existem apenas nos mamíferos. O seu valor no sangue humano está compreendido entre 150 e 400 x 10⁹/L. A principal função das plaquetas relaciona-se com a capacidade que tem o sangue de impedir a sua própria saída quando os vasos sanguíneos são lesados. Quando há ruptura de um vaso sanguíneo, as plaquetas aglutinam-se, formando um tampão, que, dependendo do calibre do vaso, pode fechar imediatamente a lesão. Além disso, participam na formação da tromboplastina, factor essencial para a transformação do fibrinogénio em fibrina, a qual forma o coágulo sanguíneo.